

Université de Montréal

**Caractérisation des mécanismes de régulation transcriptionnelle  
du gène *Cdx1***

Par

Mélanie Béland

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des Études Supérieures

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en Biologie Moléculaire

Décembre 2004

© Mélanie Béland, 2004



QH

506

U54

2005

V.019

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée  
**Caractérisation des mécanismes de régulation transcriptionnelle  
du gène *Cdx1***

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Muriel Aubry, présidente du jury  
David Lohnes, directeur de recherche  
Sylvie Mader, membre du jury  
Stefano Stifani, examinateur externe  
Muriel Aubry, représentante du doyen

Thèse acceptée le 20 mai 2005

## RÉSUMÉ

Le développement embryonnaire de la colonne vertébrale est régulé par l'interaction de plusieurs facteurs, capables d'influencer l'identité positionnelle des cellules le long de l'axe antéro-postérieur. L'acide rétinoïque (AR) joue un rôle primordial dans ce processus, puisque l'inactivation des enzymes impliqués dans son métabolisme ou celle de ces récepteurs (RAR), entraîne des transformations homéotiques vertébrales. Plusieurs évidences ont permis d'établir que ces transformations résultent d'une altération du profil d'expression de certains gènes *Hox*, les principaux médiateurs de l'identité vertébrale. D'ailleurs des éléments de réponse à l'AR (RARE) ont été identifiés dans le promoteur de plusieurs gènes *Hox*. Cependant, ceux-ci ne sont pas essentiels à l'expression des gènes *Hox* dans le mésoderme présomitique, à l'origine de l'ébauche du squelette vertébral. Par conséquent, ces observations suggèrent l'existence de facteurs intermédiaires ayant pour rôle de relayer le signal de l'AR sur le promoteur des gènes *Hox* dans le mésoderme présomitique.

À cet effet, les gènes *Cdx* (*Cdx1*, 2 et 4) encodent des facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes *Hox*. D'ailleurs, l'inactivation de *Cdx1* et/ou *Cdx2* résulte en l'apparition de transformations homéotiques vertébrales, associées à une altération de l'expression de certains gènes *Hox* dans le mésoderme. Enfin, l'expression de *Cdx1* est directement contrôlée par l'AR au jour embryonnaire 7.5 (E7.5), dans la région de la ligne primitive.

Durant l'élongation caudale de l'embryon, les transcrits *Cdx1* s'accumulent dans la région postérieure. L'AR étant absent de cette région à partir du jour E8.5, le maintien de l'expression de *Cdx1* dépend d'autres facteurs. Des études ont permis d'établir que la voie Wnt3a régule l'expression de *Cdx1* au jour E8.5, via la liaison des effecteurs nucléaires LEF/TCF à leurs éléments de réponse (LRE), présents dans la partie proximale du promoteur. D'autre part *Cdx1* est requis pour le maintien de sa propre expression puisque au jour E8.5, l'expression des transcrits est atténuée chez les mutants *Cdx1*<sup>-/-</sup>. Aussi, *Cdx1* peut induire

l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur proximal de *Cdx1*. Toutefois, ces séquences ne contiennent aucun site consensus susceptible de lier la protéine, et le mécanisme responsable de cet effet est inconnu.

Dans un premier temps, nous avons procédé à la caractérisation du mécanisme d'autorégulation de *Cdx1*. Les résultats obtenus démontrent que *Cdx1* s'autorégule en s'associant avec LEF1. L'interaction est directe et les domaines impliqués ont été identifiés. De plus, la coexpression des deux protéines entraîne un effet de synergie sur l'activité du promoteur de *Cdx1*. Cet effet est indépendant de la liaison de *Cdx1* à l'ADN mais requiert celle de LEF1 aux LRE. Enfin l'analyse du profil d'expression de *Cdx1* ainsi que celle du phénotype vertébral, chez les double-mutants *Cdx1*<sup>+/-</sup> *vt/vt* (*vt* est un allèle hypomorphe *Wnt3a*), supporte l'interaction entre la voie Wnt et l'autorégulation de *Cdx1* *in vivo*.

Dans le cadre d'un deuxième projet de recherche, nous avons voulu identifier les facteurs qui préviennent l'expression de *Cdx1* dans la partie rostrale de l'embryon, riche en AR. Nos résultats suggèrent l'implication des récepteurs nucléaires orphelins COUP-TFI/II dans l'exercice de cette fonction. L'analyse de la distribution des transcrits *in vivo* supporte cette hypothèse puisque COUP-TFI/II et *Cdx1* possèdent des profils d'expression complémentaires. De plus, nous présentons des évidences suggérant que les membres de la famille COUP-TF inhibent l'induction de l'expression de *Cdx1* par l'AR, par la compétition avec l'hétérodimère RXR-RAR pour la liaison au RARE de *Cdx1*. Enfin, les résultats obtenus révèlent que l'accumulation des transcrits COUP-TFI/II prévient l'induction de l'expression de *Cdx1* par l'AR. L'ensemble de ces observations nous a amené à proposer un modèle selon lequel l'expression de COUP-TFI/II dans la partie rostrale de l'embryon, prévient l'expression ectopique de *Cdx1* et restreint la distribution de ses transcrits à la région caudale.

**Mots clés:** Développement vertébral, acide rétinoïque, récepteur nucléaire, *Hox*, identité axiale, transformation homéotique, *Cdx*, voie Wnt, autorégulation, COUP-TF.

## ABSTRACT

The patterning of the vertebral axis is regulated by the interaction of many factors which confer positional identity. The contribution of retinoic acid (RA) to this process is of major importance since the inactivation of enzymes involved in its metabolism or that of its receptors (RAR), leads to vertebral homeotic transformations. A large number of studies have demonstrated that these transformations occur as a result of altered *Hox* gene expression. *Hox* genes encode transcription factors, which are key mediator of vertebral identity. Consistent with this, RA response elements (RARE) have been identified in the promoter of several *Hox* genes. However, these RARE are not essential for *Hox* gene expression in the presomitic mesoderm, which contributes to the anlage of vertebrae. These observations suggest the existence of intermediary factors relaying the RA signal to the promoter of *Hox* genes in the presomitic mesoderm.

*Cdx* genes (*Cdx1*, 2 and 4) encode transcription factors involved in the transcriptional regulation of some *Hox* genes. In this regard, the inactivation of *Cdx1* and/or *Cdx2* leads to vertebral homeotic transformations concomitant with altered mesodermal *Hox* gene expression. At last, *Cdx1* expression is directly controlled by RA at embryonic day 7.5 (E7.5), in the region of the primitive streak.

As the embryo elongates, *Cdx1* transcripts accumulate in the posterior region. The fact that RA is absent from this region starting at E8.5, indicates that other factors are required for the maintenance of *Cdx1* expression. Among these, Wnt3a signaling has been shown to regulate *Cdx1* expression at E8.5, through binding of LEF/TCF nuclear effectors to their response elements (LRE), located in the *Cdx1* proximal promoter. Also, *Cdx1* is required to maintain its own expression, since expression is attenuated in *Cdx1* null mutants at E8.5. Moreover, *Cdx1* can induce the expression of a reporter gene comprised of proximal *Cdx1* regulatory sequences. However, consensus *Cdx* binding motifs have not been identified in this region, and the means by which this effect is mediated is unclear.

We first proceeded to the characterization of *Cdx1* autoregulation. Our results demonstrate that *Cdx1* autoregulates through association with LEF1. The interaction is direct and domains involved have been identified. Coexpression of these proteins results in a synergistic activation of the *Cdx1* promoter. This effect is independent of *Cdx1* DNA binding but requires that of LEF1 to the LRE. Finally, the analysis of *Cdx1* expression as well as vertebral phenotypes in the *Cdx1*<sup>+/-</sup> *vt/vt* double-mutants (*vt* is an hypomorphic allele of *Wnt3a*), supports an interaction between Wnt signaling and *Cdx1* autoregulation *in vivo*.

In a second research project, we undertook the identification of factors suppressing *Cdx1* expression in the rostral embryo, which is rich in RA. Our results suggest that orphan nuclear receptors of the COUP-TF family (COUP-TFI and II) are involved in this process. The analysis of transcript distribution *in vivo* supports this hypothesis, since COUP-TFI/II and *Cdx1* exhibit complementary expression profiles. Moreover, we present evidence suggesting that COUP-TF members antagonize RA-induced *Cdx1* expression by competing with RXR-RAR heterodimers for binding to the *Cdx1* RARE. Finally, we demonstrate COUP-TFI/II accumulation prevents RA-induced *Cdx1* expression. Together, these data prompted us to propose a model according to which COUP-TFI/II expression in the rostral embryo prevents ectopic *Cdx1* expression and restricts its distribution to the caudal region.

**Key words:** Vertebral development, retinoic acid, nuclear receptor, *Hox*, axial identity, homeotic transformation, *Cdx*, Wnt pathway, autoregulation, COUP-TF.



## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES TABLES.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xv</b>

### CHAPITRE 1

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La vitamine A.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Le syndrome de déficience en vitamine A.....	2
1.1.2 Le métabolisme.....	2
1.1.2.1 Les transporteurs des rétinoïdes.....	3
1.1.2.2 Les enzymes de biosynthèse de l'acide rétinoïque .....	4
1.1.2.3 L'inactivation de l'acide rétinoïque par CYP26A1.....	7
1.1.3 La distribution de l'acide rétinoïque.....	7
1.1.3.1 L'influence de <i>Raldh2</i> et <i>Cyp26a1</i> .....	7
1.1.3.2 L'analyse de la distribution de l'acide rétinoïque <i>in vivo</i> .....	9
1.1.4 Les récepteurs de l'acide rétinoïque.....	10
1.1.4.1 La structure modulaire des récepteurs nucléaires.....	11
1.1.4.2 Les profils d'expression.....	13
1.1.4.2.1 La distribution des transcrits RAR.....	13
1.1.4.2.2 La distribution des transcrits RXR.....	15
1.1.4.3 L'inactivation des récepteurs de l'acide rétinoïque.....	15
1.1.4.4 Les éléments de réponses à l'acide rétinoïque.....	18
1.1.5 La régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.....	19
1.1.5.1 Le modèle d'échange de cofacteurs.....	19

1.1.5.2 Les coactivateurs.....	20
1.1.5.2.1 Les complexes SWI / SNF.....	21
1.1.5.2.2 Les acétyltransférases CBP / p300 / PCAF.....	22
1.1.5.2.3 Les coactivateurs de la famille p160.....	23
1.1.5.2.4 Le complexe Médiateur / TRAP / DRIP .....	24
1.1.5.3 Les corépresseurs.....	25
1.1.5.4 Les répresseurs de la famille COUP-TF.....	26
<b>1.2 Le développement vertébral.....</b>	<b>28</b>
1.2.1 L'ébauche du squelette axial.....	28
1.2.2 La périodicité de la somitogenèse.....	30
1.2.3 Les gènes Hox.....	33
1.2.3.1 Le principe de colinéarité.....	33
1.2.3.2 La spécification de l'identité vertébrale .....	36
1.2.3.3 La régulation de l'expression des gènes <i>Hox</i> par l'acide rétinoïque.....	37
<b>1.3 Les membres de la famille Cdx.....</b>	<b>39</b>
1.3.1 L'origine des gènes <i>Cdx</i> .....	39
1.3.2 Les profils d'expression.....	40
1.3.3 Le phénotype des mutants <i>Cdx</i> .....	41
1.3.4 Cdx contrôle l'expression des gènes <i>Hox</i> .....	44
1.3.5 La régulation transcriptionnelle de <i>Cdx1</i> .....	45
1.3.5.1 <i>Cdx1</i> est une cible directe de l'acide rétinoïque.....	45
1.3.5.2 La voie de signalisation Wnt.....	47
1.3.5.2.1 La voie Wnt3a et le développement vertébral.....	50
1.3.5.2.2 Wnt3a régule l'expression de <i>Cdx1</i> .....	51
<b>1.4 Les hypothèses.....</b>	<b>52</b>

## CHAPITRE 2

### ARTICLE: *Cdx1* autoregulation is governed by a novel Cdx1-LEF1

transcription complex.....	54
2.1 Avant-propos.....	55
2.2 Manuscrit.....	56

## CHAPITRE 3

### ARTICLE: COUP-TF members repress RA-induced *Cdx1* expression.....

3.1 Avant-propos.....	94
3.2 Manuscrit.....	95

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION.....

4.1 Le maintien de l'expression de <i>Cdx1</i> .....	117
4.1.1 Le rôle des ligands Wnt.....	117
4.1.2 L'autorégulation.....	119
4.2 Le rôle des FGF.....	120
4.2.1 La régulation de l'expression de <i>Xcad3</i> chez <i>Xenopus</i> .....	120
4.2.2 La régulation de <i>CdxA</i> et <i>CdxB</i> chez le poulet.....	121
4.2.3 Le cas des gènes <i>Cdx</i> chez la souris.....	121
4.3 La prévention de l'expression ectopique de <i>Cdx1</i> .....	122
4.4 Le modèle de régulation de l'expression <i>Cdx1</i> .....	124
4.5 Perspectives.....	125
4.5.1 Les interactions HMG-Cdx1.....	125
4.5.1.1 Les facteurs LEF / TCF et l'autorégulation de Cdx1.....	126
4.5.1.2 Le rôle de l'interaction SOX2-Cdx1.....	127
4.5.2 Les interactions Hox-Cdx.....	128

### RÉFÉRENCES.....

### ANNEXE.....

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE 1

<b>Figure 1-1</b> Le métabolisme de la vitamine A.....	5
<b>Figure 1-2</b> La structure modulaire des récepteurs nucléaires.....	12
<b>Figure 1-3</b> La somitogenèse.....	29
<b>Figure 1-4</b> Les gènes <i>Hox</i> .....	34
<b>Figure 1-5</b> Modèle simplifié illustrant les principaux effecteurs de la voie Wnt.....	49

### CHAPITRE 2

<b>Figure 2-1</b> Cdx1 is present on its own promoter <i>in vivo</i> .....	64
<b>Figure 2-2</b> Synergy between Cdx1 and LEF1.....	65
<b>Figure 2-3</b> Cdx1 interacts with LEF1 <i>in vivo</i> .....	67
<b>Figure 2-4</b> Cdx1 interacts directly with LEF1.....	68
<b>Figure 2-5</b> The transcriptional activation domain of Cdx1 activates the <i>Cdx1</i> promoter.....	72
<b>Figure 2-6</b> Skeletal analysis of <i>Cdx1-Wnt3a<sup>vt</sup></i> compound mutants.....	74
<b>Figure 2-7</b> Stage-specific attenuation of <i>Cdx1</i> expression in <i>Cdx1<sup>+/-</sup>Wnt3a<sup>vt/vt</sup></i> compound mutants.....	78
<b>Figure 2-8</b> The Cdx1 homeodomain interacts with Sox2 <i>in vitro</i> .....	80

### CHAPITRE 3

<b>Figure 3-1</b> <i>Cdx1</i> and <i>COUP-TFI</i> exhibit complementary patterns of expression.....	101
<b>Figure 3-2</b> COUP-TFs antagonize induction of <i>Cdx1</i> by RA and bind the <i>Cdx1</i> RARE.....	102
<b>Figure 3-3</b> COUP-TFI inhibition of <i>Cdx1</i> is dependent on DNA binding.....	105
<b>Figure 3-4</b> Relationship between RA, <i>COUP-TFI</i> and <i>Cdx1</i> expression.....	108

**CHAPITRE 4**

<b>Figure 4-1</b> Modèle de la régulation transcriptionnelle du gène <i>Cdx1</i> .....	125
----------------------------------------------------------------------------------------	-----

**ANNEXE**

<b>Figure A-1</b> Cdx1 interagit directement avec Hoxd4.....	A2
--------------------------------------------------------------	----

<b>Figure A-2</b> Cdx2 interagit aussi avec Hoxd4.....	A3
--------------------------------------------------------	----

<b>Figure A-3</b> Analyse du squelette des double-mutants <i>Hox/Cdx1</i> .....	A4
---------------------------------------------------------------------------------	----

**LISTE DES TABLES****CHAPITRE 2**

<b>TABLE 2-1</b>	Vertebral Phenotypes of Compound <i>Wnt3a<sup>vt</sup>-Cdx1</i> Mutants.....	76
------------------	------------------------------------------------------------------------------	----

**ANNEXE**

<b>TABLE A-1</b>	Phénotype vertébral des mutants <i>Hox-Cdx1</i> .....	A5
------------------	-------------------------------------------------------	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>AAA</b>	Arc Antérieur de l'Atlas
<b>ADH</b>	Alcool DésHydrogénase
<b>ADN</b>	DésoxyriboNucléique
<b>ALDH</b>	ALdéhyde DésHydrogénase
<b>AMP</b>	Adénosine MonoPhosphate
<b>APC</b>	Adenomatous Polyposis Coli
<b>AR</b>	Acide rétinoïque ou Androgen Receptor
<b>ARNm</b>	Acide RiboNucléique messenger
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>ATPase</b>	Adénosine triphosphatase
<b>CBP</b>	CREB Binding Protein
<b>CDXRE</b>	Cdx Response Element
<b>COUP-TF</b>	Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor
<b>CRABP</b>	Cellular Retinoic Acid binding Protein
<b>CRBP</b>	Cellular Retinol Binding Protein
<b>Cyp26A1</b>	Cytochrome P450 member 26A1
<b>DR</b>	Direct Repeat
<b>DRIP</b>	VDR-Interacting Proteins
<b>E</b>	Embryonnaire
<b>ER</b>	Estrogen Receptor
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FGFR</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor
<b>GR</b>	Glucocorticoid Receptor
<b>GSK</b>	Glycogen Synthase Kinase
<b>HAT</b>	Histone AcetylTransferase
<b>HDAC</b>	Histone DesACetylase
<b>LEF</b>	Lymphocyte Enhancer Factor
<b>LRE</b>	LEF Response Element

<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MEIS</b>	Myeloid Ecotropic Leukemia Virus Integration Site
<b>MR</b>	Mineralocorticoid Receptor
<b>N-CoR</b>	Nuclear receptor CoRepressor
<b>PCAF</b>	p300/CBP Associated Factor
<b>PR</b>	Progesterone receptor
<b>RAR</b>	Retinoic Acid Receptor
<b>RARE</b>	Retinoic Acid Response Element
<b>RBP</b>	Retinol Binding Protein
<b>RXR</b>	Retinoid-X Recepteur
<b>SMRT</b>	Silencing Mediator of RAR and TR
<b>SOX</b>	SRY-related HMG box
<b>SRC</b>	Steroid hormone Receptor Coactivator
<b>SRY</b>	Sex-determining Region of Y chromosome
<b>TCF</b>	T-Cell Factor
<b>TR</b>	Thyroid hormone Receptor
<b>TRAP</b>	TR-Associated Proteins
<b>TRE</b>	Thyroid hormone Response Element
<b>VDR</b>	Vitamin D Receptor
<b>VDRE</b>	Vitamin D Response Element



## REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, David Lohnes, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir ainsi permis d'acquérir les connaissances scientifiques et les habiletés techniques essentielles à ma formation.

Bien sûr, cette expérience n'aurait pas été aussi enrichissante sans la présence de mes collègues de laboratoire. J'aimerais particulièrement remercier Martin Houle, Karen Oh, Nathalie Bouchard et Jean-René Sylvestre. Ce fut un grand plaisir de travailler en leur compagnie.

Enfin je souhaite remercier Nicolas Pilon, un précieux collègue de laboratoire avec qui j'ai eu la chance de collaborer étroitement, mais aussi conjoint attentionné qui m'a soutenu tout au long de la rédaction de cette thèse. Merci infiniment !

## **CHAPITRE 1**

### **INTRODUCTION**

## 1.1 La vitamine A

### 1.1.1 Le syndrome de déficience en vitamine A

La vitamine A est essentielle au développement normal de l'embryon ainsi que pour le maintien de plusieurs tissus adultes. Le syndrome de déficience en vitamine A fait référence à l'ensemble des anomalies engendrées par un apport insuffisant en vitamine A. Chez l'adulte, une étude a démontré que la vitamine A est essentielle pour la survie, la croissance, la reproduction et la vision (Wolbach and Howe, 1925). En effet, une carence en vitamine A entraîne la dégénérescence des tubules séminifères et des photorécepteurs ainsi que la transformation métaplasique de l'épithélium digestif, respiratoire, urinaire, génital et oculaire. Chez le fœtus, une déficience en vitamine A durant la grossesse provoque l'apparition de plusieurs malformations congénitales (WILSON et al., 1953). Celles-ci sont associées à une altération du processus de morphogenèse de plusieurs organes incluant le cœur, les poumons, les reins, les yeux et les organes génitaux. Ainsi, l'ensemble de ces observations révèle l'importance d'un apport adéquat en vitamine A.

### 1.1.2 Le métabolisme

La vitamine A, ou rétinol, est un nutriment absorbé dans la diète et entreposé dans le foie. Sous cette forme, elle est inactive et doit donc être métabolisée par l'organisme en dérivés actifs. Selon le métabolite synthétisé, la vitamine A exercera une fonction dans le processus d'absorption de la lumière au niveau de la vision ou dans la régulation de l'expression génique pour la croissance et le développement. Les métabolites requis pour la régulation de l'expression génique sont les isomères *all-trans* et *9-cis* de l'acide rétinoïque (AR). Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'AR permet de prévenir ou de rétablir toutes les anomalies associées à la déficience en vitamine A chez l'adulte (à l'exception de la vision), suggérant un rôle d'importance pour ce métabolite dans la transduction du signal par la vitamine A (WILSON et al., 1953). Enfin, les deux isomères de l'AR servent de ligands pour les récepteurs nucléaires qui agissent comme

facteurs de transcription, soient le récepteur de l'AR (RAR) et le récepteur de l'acide X rétinoïde (RXR).

#### 1.1.2.1 Les transporteurs des rétinoïdes

Le rétinol libéré par le foie est véhiculé dans le sang par un transporteur protéique appelé RBP (Retinol Binding Protein) (Blaner, 1989). Une fois capté par la cellule cible, le rétinol est lié par des protéines cytoplasmiques impliquées dans le transport et le métabolisme de molécules hydrophobes. Jusqu'à ce jour, deux types ont été identifiés, CRBP-I et CRBP-II (Cellular Retinol Binding Protein type I and II) (Ong, 1987). Ces transporteurs auraient pour fonction de présenter le rétinol, et le rétinaldéhyde, aux enzymes métaboliques appropriés via des interactions protéine-protéine spécifiques. Toutefois une étude a rapporté que les souris chez lesquelles le gène CRBP-I a été inactivé, se développent normalement (Ghyselinck et al., 1999). Cela suggère que cette protéine ne soit pas indispensable au métabolisme de l'AR. Il est peu probable que la redondance fonctionnelle entre CRBP-I et II explique l'absence de phénotype, vu le peu de chevauchement entre la distribution spatiale et temporelle des deux protéines (Levin et al., 1987). L'alternative plausible envisagée impliquerait plutôt la redondance avec d'autres transporteurs CRBP encore inconnus.

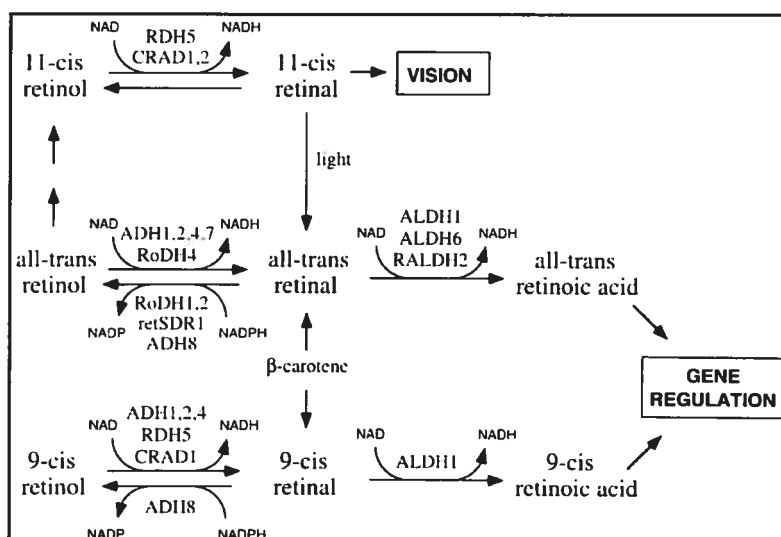
Certaines régions de l'organisme sont particulièrement sensibles à l'AR, c'est pourquoi il existe des mécanismes permettant de contrôler les niveaux auxquels s'exposent les cellules qui les composent. Ainsi, le transporteur CRABP-I (Cellular Retinoic Acid Binding Protein type I) s'associe avec l'AR et sert de substrat aux enzymes qui catalysent la dégradation de l'AR (Boylan and Gudas, 1992; Fiorella and Napoli, 1991). Le gène encodant CRABP-II a aussi été cloné (Giguere et al., 1990). Toutefois celui-ci semble remplir une tout autre fonction. En effet, plusieurs études ont démontré que CRABP-II est impliqué dans l'activation de la transcription par les récepteurs de l'AR (Bastie et al., 2001; Delva et al., 1999; Dong et al., 1999). L'importance de ces deux transporteurs dans le développement a été évaluée *in vivo* par l'inactivation des gènes correspondants, seule ou en combinaison. Malgré le fait que CRABP-I et II sont

tout deux exprimés dans plusieurs régions de l'embryon (Lyn and Giguere, 1994), les mutants CRABP-I (Gorry et al., 1994), CRABP-II (Fawcett et al., 1995) et les double-mutants CRABP-I / CRABP-II (Lampron et al., 1995) ne présentent pas d'anomalies majeures. Ces observations remettent donc en question le caractère essentiel du rôle exercé par ce type de transporteur, à moins qu'il en existe d'autres capables de remplir les mêmes fonctions.

#### 1.1.2.2 Les enzymes de biosynthèse de l'acide rétinoïque

La production d'AR à partir du rétinol fait appel à l'activité de plusieurs déshydrogénases. La figure 1-1 présente les principaux dérivés actifs de la vitamine A, ainsi que les enzymes impliqués dans son métabolisme. La première étape dans la synthèse d'AR est l'oxydation du rétinol en rétinaldéhyde. Cette réaction est catalysée par des enzymes cytoplasmiques de type « alcool déshydrogénase » (ADH) regroupés en quatre classes (ADH1-4). Parmi celles-ci, ADH 1, 2 et 4 représentent les seules enzymes capables de catalyser l'oxydation du rétinol en rétinaldéhyde (Duester, 2000). Par contre, étant donné que ADH1 et ADH4 sont exprimés dans l'embryon (Ang et al., 1996b; Ang et al., 1996a), et que l'expression de ADH2 semble limitée aux cellules du foie adulte (Svensson et al., 1999), il est peu probable que ADH2 soit impliqué dans le métabolisme de l'AR durant le développement. Par ailleurs, les mutants *Adh1*<sup>-/-</sup> (Deltour et al., 1999b) présentent une forte réduction dans leur capacité à synthétiser l'AR et les embryons de souris *Adh4*<sup>-/-</sup> (Deltour et al., 1999a) voient leur taux de survie diminuer dans des conditions où l'apport en vitamine A est déficient. Ainsi ces enzymes semblent remplir un rôle important dans la biosynthèse de rétinol mais le développement de l'embryon ne se trouve pas affecté par l'absence de chacune de ces protéines, dans des conditions normales de laboratoire.

D'autres enzymes, participant au métabolisme des rétinoïdes, mais possédant une activité différente de celle de la famille « alcool déshydrogénase » ont été identifiés. Il s'agit de RoDH1-4, CRAD1-2, RDH5 et retSDR1. Ces enzymes font partie de la famille « déshydrogénase / réductase à chaîne courte » et sont associés avec la fraction microsomale des cellules. Le fait que RoDH1-2 et



**Figure1-1:** Le métabolisme de la vitamine A. [Tiré de Duester, 2000]

retSDR1 préfèrent utiliser le NADPH comme cofacteur (Boerman and Napoli, 1995; Chai et al., 1995a; Chai et al., 1995b; Haeseleer et al., 1998), au lieu du NAD utilisé dans les réactions d'oxydation, suggère qu'ils soient davantage impliqués dans les réactions de réduction du rétinaldéhyde en rétinol. D'autre part, il a été démontré que l'activité de RoDH1, RoDH4, CRAD1 et CRAD2 est beaucoup plus efficace dans le processus d'oxydation des androgènes que dans celui des rétinoïdes (Boerman and Napoli, 1995; Chai et al., 1997; Gough et al., 1998; Su et al., 1998). L'activité de RoDH3 n'a pas été caractérisée mais sa séquence étant 98% identique à celle de RoDH1 (Chai et al., 1996), il apparaît probable qu'elle soit similaire à cette dernière. De plus, étant donné qu'aucun de ces gènes n'a été inactivé *in vivo*, il est présentement difficile d'évaluer leur importance dans le développement.

L'oxydation du rétinaldéhyde en AR est irréversible et catalysée par des enzymes cytoplasmiques de la famille « aldéhyde déshydrogénase » comme ALDH1 (Labrecque et al., 1995) et RALDH2 (Wang et al., 1996; Zhao et al., 1996). Toutefois, leur contribution n'est pas équivalente. En effet, l'activité catalytique de RALDH2 (Wang et al., 1996) est environ quinze fois plus grande que celle de ALDH1 (Penzes et al., 1997). Aussi l'analyse des profils d'expression correspondants indique que les deux enzymes sont localisés dans des tissus différents (Haselbeck et al., 1999). Il existe d'ailleurs une meilleure corrélation entre la distribution spatiale et temporelle de l'AR et RALDH2 que ALDH1. L'importance de cet enzyme a aussi été démontrée par l'inactivation du gène correspondant *in vivo*, qui résulte en l'absence de synthèse d'AR (Niederreither et al., 1999). Ces mutants présentent plusieurs anomalies dont la troncation de l'axe antéro-postérieur, la fermeture incomplète du tube neural, l'absence de bourgeon des membres ainsi que des altérations dans la formation du cœur et du rhombencéphale. Enfin l'importance du rôle exercé par RALDH2 dans la synthèse d'AR a été confirmée par la démonstration que l'administration d'AR *in utero* prévient l'apparition de la majorité de ces anomalies chez les mutants *Raldh2<sup>-/-</sup>*.

### 1.1.2.3 L'inactivation de l'acide rétinoïque par CYP26A1

Des études portant sur les effets causés par l'exposition à des doses excessives d'AR *in utero* ont permis d'établir que certaines régions de l'embryon sont plus vulnérables aux changements de concentration de ce métabolite. La nature des malformations occasionnées dépend de la dose administrée ainsi que du stade durant lequel l'embryon est exposé (Kessel and Gruss, 1991; Morriss-Kay et al., 1994). Ainsi le développement normal de l'embryon requiert un fin contrôle des niveaux d'exposition à l'AR. L'enzyme CYP26A1 joue un rôle primordial dans ce processus puisqu'il inactive l'AR en catalysant sa conversion en 4-oxo-, 4-hydroxy-, et 18-hydroxy-AR (Abu-Abed et al., 1998; Fujii et al., 1997; Ray et al., 1997; White et al., 1996; White et al., 1997). Les mutants *Cyp26a1*<sup>-/-</sup> ont été décrits (Abu-Abed et al., 2001; Sakai et al., 2001). Les anomalies détectées rappellent celles observées dans les cas de tératogénèse induite par l'administration exogène d'AR et incluent l'exencéphalie (fermeture incomplète du tube neural antérieur), la spina bifida (fermeture incomplète du neuropore postérieur), la troncation de la partie postérieure de l'embryon (pouvant mener à la fusion des membres postérieurs), ainsi que des transformations vertébrales postérieures affectant la région cervicale. Il semble que l'inactivation de ce gène permette à l'AR synthétisé par les tissus adjacents de diffuser vers les régions sensibles et d'en affecter le développement. À cet effet, il importe de mentionner qu'une étude a démontré que l'inactivation des deux isoformes du récepteur RAR $\gamma$ , combinée à celle de *Cyp26a1*, permet de rétablir le développement normal de ces double-mutants (Abu-Abed et al., 2003). Ensemble, ces résultats suggèrent que l'activité de l'enzyme CYP26A1 prévienne les effets tératogéniques engendrés par la distribution ectopique de l'AR.

### 1.1.3 La distribution de l'acide rétinoïque

#### 1.1.3.1 L'influence de *Raldh2* et *Cyp26a1*

La distribution de l'AR dans l'embryon n'est pas homogène. Elle résulte plutôt de l'activité des enzymes de synthèse et de dégradation. La sévérité des phénotypes



engendrés par l'inactivation de *Raldh2* et *Cyp26a1* démontrent l'importance de la fonction exercée par ces enzymes dans le métabolisme de l'AR et par conséquent, sur le développement de l'embryon. Les profils d'expression correspondant à ces enzymes influencent donc la distribution de l'AR, dans le temps et l'espace, et permettent de définir les sites de régulation génique.

RALDH2 est le seul enzyme de synthèse de l'AR exprimé dans l'embryon entre E7.5 et E8.5 (Drager and McCaffery, 1995). Ses transcrits sont d'abord détectés (E7.5) dans les cellules du mésoderme paraxial de la partie postérieure de l'embryon, dont la limite d'expression rostrale correspond, sans l'inclure, au nœud primitif (Niederreither et al., 1997). Par la suite (E8.5), *Raldh2* est exprimé dans les vésicules optiques, le mésoderme du tronc et les somites. À ce stade, les niveaux d'expression sont beaucoup plus élevés dans les somites antérieurs (matures) que dans les somites nouvellement formés de la région caudale. Toutefois à partir du jour E9.5, ce gradient rostro-caudal est inversé et le signal correspondant à *Raldh2* devient plus intense dans les somites postérieurs. Ainsi l'expression de *Raldh2* est éteinte suite à la différenciation des somites et au jour E11.5, seuls les somites de la région caudale expriment ces transcrits. D'autre part, *Raldh2* est aussi détecté dans certains domaines du bourgeon des membres antérieurs et postérieurs ainsi que dans le tube neural de la région lombaire et sacrée (E10.5).

Le profil d'expression de *Cyp26a1* (Fujii et al., 1997; Iulianella et al., 1999) est principalement complémentaire à celui de *Raldh2*. Les premiers transcrits sont détectés dans les cellules de l'endoderme (E6). Celles du mésoderme ne commencent à exprimer *Cyp26a* qu'au jour E7. Quelques heures plus tard (E7.25) l'expression de *Cyp26a1* s'intensifie dans le mésoderme postérieur et la ligne primitive (à l'exception du nœud). Par la suite (E7.5) ce profil s'atténue et la portion antérieure des dérivés de l'endoderme, du mésoderme et de l'ectoderme exprime *Cyp26a1*. Cette expression est transitoire puisqu'elle cesse au jour E8 pour s'accroître dans la partie caudale de l'embryon (E8.5), plus précisément dans le neurectoderme, l'endoderme viscéral ainsi que dans le mésoderme du bourgeon de la queue. Entre E9.5 et E10.5, et jusqu'au jour E11.5,

les transcrits *Cyp26a1* sont distribués postérieurement tel que décrit au stade précédent, et antérieurement dans les cellules de la crête neurale. Toutefois à partir de E10.5, le profil d'expression dans la région caudale régresse postérieurement de manière à ce que seule l'extrémité du bourgeon de la queue exprime *Cyp26a1*. Les autres régions où les transcrits sont détectés entre E9.5 et E11.5 incluent certains domaines du bourgeon des membres antérieurs et postérieurs et les yeux.

De manière intéressante des études ont démontré que l'expression de *Raldh2* et *Cyp26a1* est régulée par l'AR *in vivo*. En effet, l'expression de *Raldh2* est inhibée (Niederreither et al., 1997) alors que celle de *Cyp26a1* est induite (Iulianella et al., 1999) suite à l'administration de doses tératogéniques d'AR. D'ailleurs, le promoteur de *Cyp26a1* contient un élément de réponse à l'AR capable de lier l'hétérodimère RXR-RAR, et dont l'intégrité est essentiel à l'activation d'un gène rapporteur par l'AR (Loudig et al., 2000). Ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme de rétroaction permettant de contrôler les niveaux d'AR dans l'embryon en développement.

#### 1.1.3.2 L'analyse de la distribution de l'acide rétinoïque *in vivo*

Une approche utilisée pour localiser l'AR *in vivo* consiste à mettre en évidence les sites d'action de l'AR en tant que régulateur transcriptionnel. Cette technique indirecte implique l'analyse de souris transgéniques qui expriment le gène rapporteur *LacZ* sous le contrôle des séquences régulatrices d'un gène cible de l'AR. Deux groupes indépendants ont fait appel à cette stratégie en se servant de l'élément de réponse à l'AR du promoteur de *RARβ*, couplé à un promoteur minimal hétérologue (Balkan et al., 1992; Rossant et al., 1991). Les résultats obtenus révèlent que l'expression la plus précoce du transgène est observée au jour E7.5 dans la moitié postérieure de l'embryon, délimitée antérieurement par le nœud primitif. Un jour plus tard (E8.5), la zone d'activité définit par la  $\beta$ -galactosidase comprend la région du tronc située entre le premier somite formé et le nœud primitif, qui correspond maintenant à la limite d'expression postérieure. À ce stade, les cellules des vésicules optiques commencent aussi à exprimer le

transgène. Ce profil est stable et maintenu durant les autres stades analysés (E9.5-E10.5). Parmi les tissus négatifs pour le marquage de l'activité  $\beta$ -galactosidase on retrouve le foie ainsi que les bourgeons des membres. D'une manière générale, l'ensemble de ces données démontre que la distribution de l'AR est le reflet du profil d'expression complémentaire de *Raldh2* et *Cyp26a*, qui possèdent une activité opposée dans le métabolisme de l'AR.

#### 1.1.4 Les récepteurs de l'acide rétinoïque

La capacité d'une cellule à répondre à l'AR dépend de l'expression des récepteurs nucléaires qui utilisent ce métabolite comme ligand. Il existe deux familles de récepteurs nucléaires pouvant traduire les effets de l'AR : la famille RAR, activée par les isomères *all-trans* et *9-cis* de l'AR, et la famille RXR, uniquement activée par l'isomère *9-cis*. Ensemble les RAR et les RXR font partie de la superfamille des récepteurs stéroïdiens / thyroïdiens qui inclut entre autres, les récepteurs aux hormones stéroïdienne et thyroïdienne, les récepteurs de la vitamine D3 et un grand nombre de récepteurs orphelins (Mangelsdorf and Evans, 1995). Ceux-ci possèdent une structure modulaire à six domaines (A-F) propre aux récepteurs nucléaires. La grande homologie de séquences qui caractérise les membres appartenant à cette superfamille est d'ailleurs à l'origine de la découverte de plusieurs récepteurs nucléaires (Giguere, 1994). En effet, un fragment du domaine de liaison à l'ADN a été largement utilisé comme sonde pour cribler le génome et a permis l'identification de plusieurs récepteurs nucléaires. Aussi, le fait que les domaines des récepteurs nucléaires puissent être substitués entre les membres d'une même famille (Green and Chambon, 1987) a facilité l'identification des ligands. La création d'un récepteur chimérique (dans lequel le domaine de liaison à l'ADN du récepteur orphelin est remplacé par celui d'un récepteur nucléaire connu) et l'évaluation de son activité sur un gène rapporteur en présence de différents ligands, représente une stratégie efficace pour identifier le ligand d'un récepteur (Giguere and Evans, 1990). C'est ainsi que par exemple, l'AR *all-trans* a pu être associé aux RAR (Giguere et al., 1987; Petkovich et al., 1987).

#### 1.1.4.1 La structure modulaire des récepteurs nucléaires (Figure 1-2)

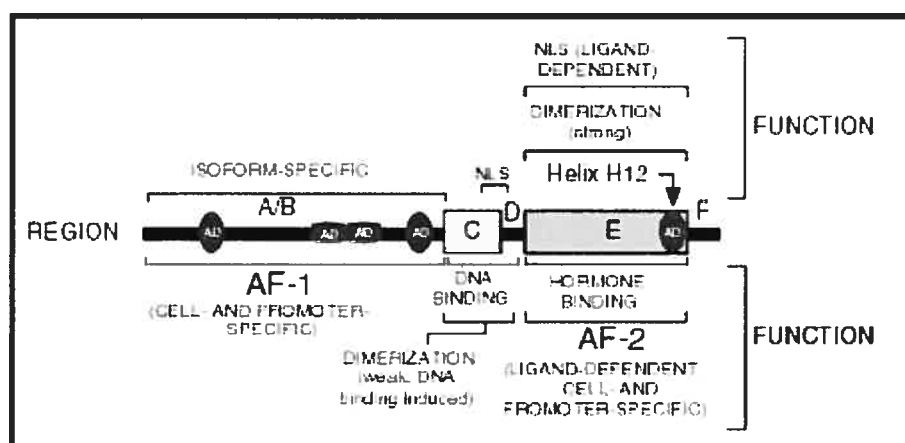
Les familles RAR et RXR sont toutes deux constituées de trois isotypes, encodés par trois gènes différents: RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) et RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). De plus, chacun de ces gènes génère plusieurs isoformes (Chambon, 1996). Il existe deux isoformes pour RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$ , et quatre pour RAR $\beta$ . D'autre part, tous les isotypes RXR produisent deux isoformes. L'utilisation différentielle de deux promoteurs et l'épissage alternatif sont les mécanismes à l'origine de la production de tels isoformes.

La région amino-terminale du domaine A/B diffère grandement entre les isoformes générés par un même gène. Toutefois sa séquence est hautement conservée d'une espèce à l'autre pour un même isoforme. Le domaine A/B possède une fonction de transactivation, appelée AF-1, spécifique au contexte du promoteur ainsi qu'au type cellulaire (Nagpal et al., 1992; Nagpal et al., 1993). Il est à noter que l'activité de AF-1 est indépendante de la liaison du récepteur au ligand mais potentialise celle de la fonction AF-2 localisée dans le domaine de liaison au ligand (Nagpal et al., 1993).

Le domaine C correspond au domaine de liaison à l'ADN. Il contient une séquence de soixante-six acides aminés, hautement conservée entre les membres de la famille des récepteurs nucléaires. Cette séquence comprend deux motifs « doigt de zinc » organisés sous la forme d'hélices  $\alpha$ . La première hélice est impliquée dans la reconnaissance spécifique du site de liaison à l'ADN, alors que la seconde contribue à la stabilisation du complexe formé via 1) son interaction non-spécifique avec l'ADN et 2) sa fonction de dimérisation lui permettant d'interagir avec le domaine de liaison à l'ADN d'autres récepteurs (Green et al., 1988).

Le domaine D se trouve entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand. Bien que son rôle soit encore obscur, il a été proposé que cette région serve de pivot afin d'accommoder les changements de conformation du récepteur, associés à la liaison aux différents éléments de réponse (Mangelsdorf and Evans, 1995).

Le domaine E, ou domaine de liaison au ligand, est composé d'environ deux cent vingt-cinq acides aminés. Sa séquence est largement conservée entre les isoformes d'une même famille. En plus de sa capacité de liaison au ligand (Evans, 1988; Green and Chambon, 1988) il possède plusieurs rôles incluant une fonction de répression (Baniahmad et al., 1992), une interface de dimérisation impliquée dans l'interaction avec d'autres récepteurs nucléaires (Fawell et al., 1990; Forman et al., 1989) ainsi qu'une fonction de transactivation AF-2 (Nagpal et al., 1992). Contrairement à la fonction de transactivation AF-1 située dans le domaine A/B, l'activité de AF-2 dépend de la liaison du récepteur au ligand.



**Figure 1-2:** La structure modulaire des récepteurs nucléaires.

[[http://www.cbs.univ-montp1.fr/MAJ/SP/W.Bourguet/Website/research\\_focus.html](http://www.cbs.univ-montp1.fr/MAJ/SP/W.Bourguet/Website/research_focus.html)]

### 1.1.4.2 Les profils d'expression

#### 1.1.4.2.1 La distribution des transcrits RAR

D'une manière générale, l'expression de RAR $\alpha$  se caractérise par la distribution uniforme de ses transcrits, alors que celle de RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  est restreinte à certains tissus spécifiques (Dolle et al., 1989; Dolle et al., 1990; Ruberte et al., 1990; Ruberte et al., 1991; Ruberte et al., 1993). Une étude récente a permis d'établir le profil d'expression propre à chaque isoforme RAR (Mollard et al., 2000). Au jour E8.5, l'expression de RAR $\alpha$ 1 / 2,  $\beta$ 1 / 3 et  $\gamma$ 1 est diffuse dans tout l'embryon. Par contre, celle de RAR $\beta$ 2 / 4 est particulièrement élevée dans l'épithélium du tube neural et l'endoderme viscéral antérieur, et les transcrits RAR $\gamma$ 2 sont concentrés dans la partie caudale du tube neural. Un jour plus tard, l'expression de RAR $\alpha$ 1 / 2 est toujours ubiquitaire, quoique celle de l'isoforme  $\alpha$ 2 commence à s'intensifier dans le tube neural. Tous les isoformes  $\beta$  sont coexprimés dans le tube neural et le mésenchyme frontonasal alors qu'un profil plus spécifique est observé pour RAR $\beta$ 2 / 4 au niveau de l'endoderme viscéral antérieur, et pour RAR $\beta$ 1 / 3 dans les cellules mésenchymales des arcs branchiaux. Les deux isoformes  $\gamma$  sont coexprimés dans le mésenchyme des arcs branchiaux, du bourgeon des membres antérieures et de la queue, et de la région frontonasale. Au jour E10.5, les transcrits RAR $\alpha$ 1 sont encore distribués de manière ubiquitaire, mais l'expression est particulièrement élevée dans le mésenchyme des arcs branchiaux, le mésoderme somitique, l'endoderme viscéral et le tube neural. L'isoforme  $\alpha$ 2 est aussi détecté dans l'épithélium du tube neural mais son expression s'étend davantage antérieurement, jusqu'au niveau du rhombomère sept (r7) et aussi dans le r4. À ce stade, les isoformes  $\beta$  sont tous coexprimés dans le tube neural jusqu'à la partie caudale du rhombencéphale (r7) et dans le cœur en développement. Les transcrits RAR $\beta$ 2 / 4 sont aussi spécifiquement détectés au niveau du mésenchyme périoculaire et frontonasal, dans l'endoderme viscéral, les cellules épithéliales et mésenchymales du bourgeon pulmonaire et dans le mésenchyme du bourgeon des membres.

L'expression de  $RAR\gamma 1 / 2$  est principalement détectée dans les cellules du mésenchyme frontonasal et des arcs branchiaux, le sclérotome et les bourgeons des membres antérieurs, le mésenchyme de la trachée et les bourgeons des membres postérieurs nouvellement formés. Au jour E11.5, la distribution des transcrits  $RAR\alpha 1 / 2$  est semblable à celle décrite pour le jour précédent. Dans le cas des isoformes  $\beta$ , leur expression demeure élevée dans le tube neural et la partie caudale du rhombencéphale. Les quatre isoformes sont aussi détectés dans le mésenchyme frontonasal et périoculaire, mais les niveaux d'expression de  $RAR\beta 2 / 4$  sont plus intenses que ceux de  $RAR\beta 1 / 3$ . Par ailleurs, les transcrits  $RAR\beta 2 / 4$  sont exprimés dans les cellules épithéliales et mésenchymales de la trachée et l'œsophage alors que ceux de  $RAR\beta 1 / 3$  ne sont détectés que dans leur composante mésenchymale. Enfin,  $RAR\beta 1 / 3$  demeurent exprimés dans le cœur et  $RAR\beta 2 / 4$  dans le mésenchyme proximal du bourgeon des membres. L'expression des isoformes  $RAR\gamma 1 / 2$  persiste dans le sclérotome durant sa condensation en cartilage ainsi que dans le mésenchyme proximal des bourgeons des membres postérieurs. D'autres sites où les transcrits sont détectés incluent entre autres, le mésenchyme craniofacial et celui de la trachée. Au jour E13.5, l'isoforme  $RAR\alpha 1$  est exprimé de manière ubiquitaire mais ses niveaux sont particulièrement élevés dans le cœur, l'hypophyse, et divers épithélium (nasal, oral, gastrique, viscéral). Alors que l'expression de  $RAR\alpha 1$  est très faible dans le tube neural et complètement absente de la portion antérieure du système nerveux central (SNC), les transcrits  $RAR\alpha 2$  y sont abondants. Les isoformes  $\beta$  sont tous coexprimés dans certaines structures du SNC antérieur, dans le tube neural, le mésenchyme périoculaire et frontonasal, et le cœur. Des niveaux élevés d'expression sont également détectés dans les cellules du mésenchyme génital. Enfin, les transcrits  $RAR\gamma 1 / 2$  sont principalement détectés au niveau du sclérotome, de la peau, de la queue et des membres.

#### 1.1.4.2.2 La distribution des transcrits RXR

L'étude de la distribution des transcrits des RXR a permis d'établir que les membres de cette famille présentent des profils d'expression uniques, qui se chevauchent partiellement (Dolle et al., 1994; Mangelsdorf et al., 1992). Comme dans le cas de  $RAR\alpha$ , l'expression de  $RXR\beta$  est essentiellement ubiquitaire à tous les stades observés entre E8 et E16.5. Celle de  $RXR\alpha$  l'est aussi, entre E8.5 et E14.5, mais devient restreinte à partir de E16.5 à l'épiderme de la peau, à l'épithélium de la cavité oral et nasal ainsi qu'à celui de l'estomac. Les autres tissus où l'isotype  $\alpha$  est détecté incluent le pancréas, les glandes surrénales et l'intestin. Malgré le fait que l'expression de  $RXR\gamma$  soit diffuse entre les jours E8 et E9.5, son profil d'expression dans les stades ultérieurs est beaucoup plus spécifique que celui des deux autres isotypes. À partir de E10.5 ses transcrits sont principalement détectés dans les cellules du mésoderme paraxial à tous les niveaux de l'axe antéro-postérieur. Un jour plus tard, le mésenchyme proximal des bourgeons des membres antérieurs, le bourgeon de la queue et certaines structures du SNC antérieur expriment aussi  $RXR\gamma$ . Au jour E12.5 ses transcrits sont également détectés dans divers muscles incluant ceux de la région cervicale, du tronc et des membres. À ce stade, les cellules du tube neural commencent aussi à exprimer  $RXR\gamma$ . Enfin, les autres sites où sont détectés  $RXR\gamma$  incluent la rétine (E13.5) ainsi que l'hypophyse (E15.5) et thyroïde (E16.5).

#### 1.1.4.3 L'inactivation des récepteurs de l'acide rétinoïque

Étant donné que la séquence en acides aminés des RAR est hautement conservée entre les espèces et que chaque isotype (et même isoforme) présente un profil d'expression unique durant le développement embryonnaire, il a initialement été proposé que chaque récepteur exerce une fonction unique (Chambon, 1994). Cette hypothèse a été étudiée *in vivo* via l'inactivation de plusieurs isoformes. Toutefois, il a été démontré que les mutants  $RAR\alpha1^{-/-}$  (Li et al., 1993; Lufkin et al., 1993),  $RAR\beta2^{-/-}$  (Mendelsohn et al., 1994b),  $RAR\gamma1^{-/-}$  (Subbarayan et al., 1997) et  $RAR\gamma2^{-/-}$  (Lohnes et al., 1993) apparaissent principalement normaux. D'autres mutants chez qui tous les isoformes d'un isotype donné sont inactivés,



ont aussi été générés. Alors que les souris  $RAR\beta^{-/-}$  ne présentent aucun phénotype (Luo et al., 1995), les mutants  $RAR\alpha^{-/-}$  (Lufkin et al., 1993) et  $RAR\gamma^{-/-}$  (Lohnes et al., 1993) présentent certaines anomalies associées au syndrome post-natal de déficience en vitamine A, incluant la diminution du taux de survie, le retard de croissance et la stérilité chez le male. De plus des transformations homéotiques vertébrales affectant la région cervicale ont aussi été observées chez les mutants  $RAR\gamma^{-/-}$ , bien que la pénétrance liée à ce phénotype soit incomplète. De manière intéressante, l'inactivation des isoformes  $\gamma$  entraîne une résistance complète face à certains effets tératogéniques engendrés par une dose exogène d'AR. Par exemple, cette mutation prévient la troncation axiale (lombosacrée) et la spina bifida qui sont causées par l'administration maternelle d'AR au jour E8.5. Ainsi,  $RAR\gamma$  est impliqué dans la transduction de certaines anomalies induites par l'excès d'AR.

Les mutants générés par l'inactivation de tous les isoformes  $RAR\alpha$  ou  $\gamma$  ne présentent aucune des anomalies congénitales caractéristiques de la déficience fœtale en vitamine A. De plus, seulement une faible proportion de tous les tissus qui expriment  $RAR\gamma$  ou  $RAR\alpha$  est affectée chez les mutants correspondants. Dans le but d'évaluer la contribution des  $RAR$  dans la transduction du signal par la vitamine A et d'explorer la possibilité d'une redondance fonctionnelle entre les membres de la famille  $RAR$ , une série de double-mutants  $RAR$  a été générée (Lohnes et al., 1994; Mendelsohn et al., 1994a). Contrairement aux simple-mutants, les double-mutants meurent *in utero* ou peu après la naissance. Ensemble, les anomalies causées par l'inactivation de plusieurs combinaisons de  $RAR$  permettent de récapituler toutes les malformations congénitales observées dans le syndrome foetal de déficience en vitamine A. Ces résultats indiquent donc que l'AR est le dérivé actif de la vitamine A durant le développement, et que ces effets sont traduits par les  $RAR$ . Les phénotypes observés permettent également d'affirmer que les membres de la famille  $RAR$  exercent des fonctions redondantes dans le développement de divers tissus.

Par ailleurs, certains double-mutants présentent aussi des anomalies qui ne sont pas associées au syndrome de déficience en vitamine A. Ceci s'explique

probablement par l'impossibilité d'accéder à un état complet de déficience en vitamine A compatible avec la survie et la grossesse. Ces anomalies incluent entre autres, l'exencéphalie ainsi que des transformations homéotiques vertébrales de la région cervicale et thoracique. D'ailleurs il est intéressant de noter que la sévérité et la pénétrance des transformations homéotiques observées chez les mutants  $RAR\gamma^{-/-}$  est augmentée par l'ablation additionnelle et progressive des isoformes  $\alpha$ . De plus, les double-mutants  $RAR\beta2\gamma$  et  $RAR\alpha\beta2$  présentent aussi des transformations homéotiques des vertèbres de la région cervicale. Ainsi ces résultats constituent une preuve de l'importance du rôle de l'AR et de ces récepteurs dans le développement vertébral et démontrent encore une fois le caractère redondant de la fonction des RAR.

Les mutants pour les différents isotypes RXR ont aussi été décrits. Les souris  $RXR\gamma^{-/-}$  sont viable et morphologiquement normales (Krezel et al., 1996), alors que la mutation qui affecte l'expression de  $RXR\beta$  cause la stérilité chez le male (Kastner et al., 1996). D'autre part, l'inactivation de tous les isoformes  $\alpha$  entraîne des malformations cardiaques causant la mort autour du jour E15.5, ainsi que certaines anomalies oculaires (Dyson et al., 1995; Kastner et al., 1994; Sucov et al., 1994). Le fait que ces deux phénotypes soient également observés chez certains double-mutants RAR, suggère que la fonction de  $RXR\alpha$  dans le développement de ces structures dépende de la formation d'hétérodimères avec les RAR. De plus, le phénotype des double-mutants  $RXR\alpha\gamma$  et  $RXR\beta\gamma$  est identique à celui des simple-mutants  $RXR\alpha$  et  $RXR\beta$  correspondants, ce qui suggère que la fonction exercée par l'isotype  $\gamma$  puisse être substituée par celle de  $\alpha$  ou  $\beta$ . Enfin il apparaît évident qu'un seul allèle  $\alpha$  soit suffisant pour accomplir toutes les fonctions des RXR, puisque les triple-mutants  $RXR\alpha^{+/-}\beta\gamma$  sont viables et apparemment normaux (Krezel et al., 1996).

Le rôle des hétérodimères RXR-RAR dans la transduction du signal de la vitamine A durant le développement, a ensuite été confirmé par la production de double-mutants RXR / RAR (Kastner et al., 1994; Kastner et al., 1997). Essentiellement, les résultats obtenus indiquent que l'inactivation d'un seul

isotype RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ), combinée à celle des deux isoformes RXR $\alpha$ , est suffisante pour induire une augmentation de la sévérité du phénotype observé par rapport aux simple-mutants RAR. En effet, les mutants RXR $\alpha$  / RAR présentent les mêmes anomalies que celles générées par la production de double-mutants RAR et ensemble, permettent de récapituler tous les aspects du syndrome fœtal de déficience en vitamine A. À l'opposé, les double-mutants RXR / RAR, chez qui les deux isoformes RXR $\beta$  ou  $\gamma$  sont inactivés, ne produisent aucun effet de synergie phénotypique par rapport aux simple-mutants RAR.

#### 1.1.4.4 Les éléments de réponses à l'acide rétinoïque

Les récepteurs nucléaires régulent la transcription en liant de courtes séquences d'ADN, appelées éléments de réponse, localisées dans le promoteur des gènes cibles. Ce sont les trois premiers acides aminés du premier doigt de zinc contenu dans le domaine de liaison à l'ADN du récepteur (boîte P) qui confèrent la spécificité de la liaison à l'élément de réponse (Giguere, 1994). La composition de la boîte P permet de diviser les membres de la famille des récepteurs nucléaires en deux classes. La classe I comprend les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), minéralocorticoïdes (MR), à la progestérone (PR) et aux androgènes (AR), qui reconnaissent le demi-site consensus TGTCT. Les récepteurs aux estrogènes (ER), à l'hormone thyroïdienne T3 (TR), à la vitamine D3 (VDR), à l'AR (RAR et RXR) ainsi que la majorité des récepteurs nucléaires orphelins constituent la classe II et lient le demi-site consensus PuGGTCA (où Pu est une purine).

Le motif reconnu par les récepteurs aux hormones stéroïdiennes est organisé en un double hexamère inversé (ou palindrome), séparé par trois nucléotides. La liaison à cet élément de réponse se fait exclusivement sous la forme d'homodimères. À l'opposé, les récepteurs non-stéroïdiens ont la capacité de former des homo ou des hétérodimères sur le motif lié, dont la configuration est variable. Initialement un modèle fut élaboré selon lequel les éléments de réponse reconnus par les récepteurs à la vitamine D (VDRE), à l'hormone thyroïdienne (TRE) et à l'AR (RARE), sont constitués par un double hexamère (DR, Direct Repeat) séparé par trois (DR3), quatre (DR4) ou cinq (DR5)

nucléotides, respectivement (Umesono et al., 1991). Ce modèle, connu sous le nom de la règle 3-4-5, a ensuite été modifié après la mise en évidence d'autres RARE. Cette nouvelle règle (règle 1-5) inclue maintenant la reconnaissance du motif DR1 par les RXR, et celle des motifs DR1 et DR2 par les RAR (dans l'hétérodimère RXR-RAR). En plus des motifs DR, il existe un grand nombre de RARE comme les éléments palindromiques et autres variantes dont la séquence, l'espacement et l'orientation peuvent changer (Giguere, 1994).

RXR constitue le partenaire d'hétérodimérisation des RAR, TR, VDR et de plusieurs récepteurs nucléaires orphelins. Il a été démontré que cette interaction a pour effet d'augmenter l'affinité des RAR, TR et VDR pour leur élément de réponse (Leid et al., 1992; Yu et al., 1991). Selon plusieurs, cette association se produirait en deux étapes (Chambon, 1996; Mangelsdorf and Evans, 1995). D'abord, l'interaction des interfaces de dimérisation contenues dans le domaine de liaison au ligand de chacun des récepteurs en solution. Ensuite, la liaison à l'ADN du complexe formé favoriserait l'interaction spécifique des deux récepteurs via l'interface de dimérisation présente dans chaque domaine de liaison à l'ADN. Sur l'élément, RXR occupe la partie 5' de l'hexamère, alors que son partenaire occupe la partie 3' (Kurokawa et al., 1993; Perlmann et al., 1993; Zechel et al., 1994). Pour RXR, la formation d'un hétérodimère avec les RAR, TR et VDR, empêche sa liaison à l'AR 9-*cis* et par conséquent, sa fonction de transactivation dépendante du ligand est abolie (Forman et al., 1995; Kurokawa et al., 1994). Dans ces cas, RXR constitue donc un partenaire d'hétérodimérisation silencieux.

### 1.1.5 La régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires

#### 1.1.5.1 Le modèle d'échange de cofacteurs

Les récepteurs nucléaires régulent l'expression génique en s'associant avec des cofacteurs impliqués dans l'activation ou la répression de la transcription. L'échange de cofacteurs est modulé par la liaison du ligand au récepteur, qui

influence directement l'affinité des coactivateurs et corépresseurs pour le récepteur (Glass and Rosenfeld, 2000).

Les coactivateurs interagissent avec le domaine de liaison au ligand des récepteurs nucléaires par l'intermédiaire du motif LXXLL (L est une leucine et X n'importe lequel des acides aminés). Ce motif forme une courte hélice  $\alpha$  capable de se loger dans la cavité hydrophobe formée par les hélices 3, 5 et 6 du domaine de liaison au ligand. La liaison du ligand au récepteur induit un changement de conformation important, qui déplace l'hélice 12 (comprenant le domaine AF-2) de manière à ce que celle-ci vienne juxtaposer la cavité hydrophobe. Ce mouvement entraîne la création d'une fente, entre les hélices 3 et 12, dans laquelle vient s'ancrer le motif LXXLL des coactivateurs. Les résidus glutamate (du domaine AF-2) et lysine (de l'hélice 3), établissent des liens « hydrogène » avec la première et cinquième leucine de l'hélice  $\alpha$ . La particularité de cette fente réside dans le fait qu'elle ne peut accommoder qu'une hélice d'une longueur particulière. Ainsi l'hélice du motif LXXLL s'insère parfaitement entre les résidus glutamate et lysine.

Le motif des corépresseurs, impliqué dans l'interaction avec le domaine de liaison au ligand des récepteurs nucléaires, correspond à la séquence LXXXIXXXI/L (I est une isoleucine). L'hélice formée par ce motif est plus allongée, par rapport à celle du motif LXXLL. En absence de ligand, elle occupe la même cavité hydrophobe reconnue par les coactivateurs. Cependant, les changements de structure engendrés par la liaison du ligand au récepteur ne permettent plus l'ancrage du motif LXXXIXXXI/L dans cette cavité, puisque la fente créée par les hélices 3 et 12 est spécifique à la longueur de l'hélice LXXLL des coactivateurs. Ainsi le déplacement de l'hélice 12, résultant de la liaison du récepteur au ligand, permet la discrimination entre l'hélice LXXLL des coactivateurs et l'hélice allongée LXXXIXXXI/L des corépresseurs.

#### 1.1.5.2 Les coactivateurs

L'intégrité du domaine AF-2 est essentielle à l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires ligandés. D'ailleurs ce domaine est hautement conservé

et présent chez tous les membres de la famille des récepteurs nucléaires. Toutefois, sa séquence ne contient aucun motif consensus propre aux activateurs transcriptionnels. Ensemble ces évidences ont amené les chercheurs à émettre l'hypothèse que ce domaine puisse servir de surface d'interaction pour des cofacteurs dont la fonction serait de traduire l'activation par les récepteurs nucléaires. Depuis, un grand nombre de coactivateurs, interagissant avec le domaine AF-2 et requis pour la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires, ont été identifiés. Ils se présentent sous la forme de complexes multiprotéiques et sont impliqués dans le remodelage de la chromatine et le recrutement de facteurs qui composent le complexe d'initiation de la transcription. Parmi les mieux caractérisés, on retrouve les complexes SWI / SNF, les activateurs p160, les activateurs acétyltransférases CBP / p300 / PCAF et le complexe Médiateur / TRAP / DRIP.

#### 1.1.5.2.1 Les complexes SWI / SNF

L'ADN des eucaryotes est organisé sous la forme de chromatine. Cet arrangement compact exerce un effet de répression général sur la transcription des gènes. Les complexes SWI / SNF facilitent l'accès des facteurs de transcription au promoteur des gènes cibles en induisant un changement local de la structure de la chromatine (Owen-Hughes et al., 1996). D'abord identifiés chez la levure, ces complexes sont aussi présents et conservés chez les eucaryotes (Peterson and Workman, 2000). Le mécanisme utilisé pour relâcher la structure de la chromatine nécessite l'hydrolyse d'ATP et consiste à défaire les liaisons qui unissent les histones à l'ADN (Narlikar et al., 2002). Chaque complexe SWI / SNF comprend donc une sous-unité ATPase, correspondant à BRG1 ou BRM chez les mammifères.

Plusieurs études ont permis d'établir l'importance de la fonction exercée par les complexes SWI / SNF dans l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires. Notamment, Ichinose et al. ont démontré que BRG1 et BRM interagissent avec le récepteur aux estrogènes et ce, uniquement lorsque celui-ci est ligandé (Ichinose et al., 1997). De plus, l'introduction d'une mutation affectant l'activité de BRG1 ou BRM cause une diminution importante de la

capacité des RAR, ER et GR à activer la transcription (Chiba et al., 1994; Muchardt and Yaniv, 1993). Les résultats obtenus par un autre groupe indiquent aussi que l'interaction de BRG1 avec le GR est essentielle que si le promoteur du gène cible est organisé sous la forme de chromatine (Fryer and Archer, 1998), confirmant le rôle des complexes SWI / SNF dans l'activation de la transcription.

#### 1.1.5.2.2 Les acétyltransférases CBP / p300 / PCAF

L'effet de répression qu'exerce la structure de la chromatine sur la transcription peut aussi être surmonté par le recrutement de complexes protéiques, possédant une activité acétyltransférase, sur le promoteur des gènes cibles (Kingston and Narlikar, 1999). En effet, l'état d'acétylation des histones, sur les résidus de lysines du domaine amino-terminal de la protéine, est intimement lié à l'activité transcriptionnelle d'une région donnée. Plusieurs coactivateurs, disposant d'une activité histone-acyltransférase (HAT) intrinsèque, ont été identifiés. Parmi ceux-ci on retrouve PCAF (Yang et al., 1996), CBP (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996) et p300 (Ogryzko et al., 1996).

Chez la levure, le multicomplexe SAGA permet l'activation de la transcription à partir d'une matrice d'ADN organisée sous forme de chromatine (Brownell et al., 1996). L'activité HAT, assurée par la sous-unité GCN5, est essentielle à la fonction transcriptionnelle de SAGA. La formation d'un tel complexe existe également chez les mammifères (Ogryzko et al., 1998), où PCAF constitue l'homologue de GCN5. La démonstration d'une interaction entre PCAF et le domaine de liaison au ligand de RAR (Blanco et al., 1998) suggère que celui-ci soit impliqué dans la régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires. Par contre, le fait que cette interaction se produise indépendamment de la liaison du récepteur au ligand, suscite un doute quant à la spécificité de la fonction d'activation de PCAF.

Divers mécanismes d'action, employés par CBP et p300 dans l'activation de la transcription, peuvent être envisagés si on considère que ces derniers ont la capacité 1) d'acétyler les histones ainsi que d'autres facteurs du complexe d'initiation de la transcription et 2) de former des complexes stables avec

plusieurs facteurs de transcription de base (Glass and Rosenfeld, 2000). Toutefois plusieurs études ont permis d'élucider leur rôle dans l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires. L'interaction entre CBP / p300 et les récepteurs nucléaires est dépendante de la liaison au ligand et résulte en une augmentation de l'activité transcriptionnelle par les récepteurs ligandés (Chakravarti et al., 1996; Kamei et al., 1996). En plus du fait que le traitement de cellules à l'AR entraîne une augmentation rapide de l'acétylation des histones sur le promoteur des gènes cibles, il a aussi été démontré que la mutation qui affecte l'activité HAT de CBP et p300 prévient l'effet de potentialisation observé sur l'activation de la transcription par les RAR en présence d'AR (Chen et al., 1999c). Ces résultats suggèrent donc que l'AR induise l'hyperacétylation des histones sur les sites de régulation des RAR via l'activité HAT de CBP / p300. Un lien entre ces cofacteurs et le remodelage de la chromatine a pu être établi suite à la démonstration que la présence de p300 permet de lever la répression associée à la structure condensée de la chromatine (Kraus and Kadonaga, 1998). Cet effet est spécifique à l'organisation nucléosomale de l'ADN et dépend de la liaison du ligand au récepteur.

#### 1.1.5.2.3 Les coactivateurs de la famille p160

Bien que CBP et p300 puissent interagir directement avec les récepteurs nucléaires, leur effet sur la transcription résulte probablement de l'interaction avec les coactivateurs de la famille p160 (Demarest et al., 2002; Li et al., 2000; Sheppard et al., 2001). Ces protéines (dont la masse approximative est de 160 kDa) interagissent avec les récepteurs nucléaires seulement lorsque ceux-ci sont ligandés (Cavailles et al., 1994; Halachmi et al., 1994; Kurokawa et al., 1995). Les trois membres qui constituent cette famille sont: SRC1, SRC2 et SRC3 (Glass and Rosenfeld, 2000). En plus de permettre le recrutement des HAT, une étude a révélé que les coactivateurs p160 pouvaient lier une protéine de la famille méthyltransférase, appelée CARM1 (Chen et al., 1999a). Selon les résultats de cette étude, la collaboration entre les deux facteurs entraîne une augmentation de la transcription par les récepteurs nucléaires. De manière intéressante, il a été



démontré que CARM1 méthyle plusieurs résidus arginine de l'histone H3 (Schurter et al., 2001) et que la méthylation de cette histone est associée à l'activation de la transcription (Bauer et al., 2002). Selon l'hypothèse du code des histones (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000), l'ensemble des modifications post-traductionnelles des histones détermine le statut de la chromatine. Deux des mécanismes envisagés expliquant comment la modification des histones altère la structure de la chromatine sont: la neutralisation de la charge positive du domaine amino-terminal des histones (Luger and Richmond, 1998) et la création de nouveaux sites de liaison pour les protéines qui contribuent au remodelage de la chromatine (Jacobson et al., 2000; Jenuwein, 2001; Rice and Allis, 2001). Ainsi le recrutement de méthyltransférases et d'HAT par les coactivateurs p160 favorise la modification des histones et l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires.

#### 1.1.5.2.4 Le complexe Médiateur / TRAP / DRIP

Les complexes TRAP (TR-Associated Proteins) et DRIP (VDR Interacting Proteins) sont très similaires, sinon identiques. Leurs sous-unités ont été purifiées par affinité pour le TR (Fondell et al., 1996a) ou le VDR (Rachez et al., 1998), respectivement. Des études ont révélé que ces complexes sont impliqués dans l'activation de la transcription par les TR (Fondell et al., 1996b; Fondell et al., 1999) et VDR (Rachez et al., 1999). D'ailleurs la sous-unité TRAP220, aussi appelé DRIP205, interagit avec le domaine AF-2 du TR et VDR, en présence de leur ligand respectif (Rachez et al., 2000; Ren et al., 2000). Toutefois la démonstration d'une interaction directe entre TRAP220 et plusieurs autres récepteurs nucléaires ligandés, suggère que le complexe constitue un coactivateur général (Yuan et al., 1998).

Contrairement aux complexes formés par p160 et CBP / p300, les complexes TRAP / DRIP ne semble pas agir au niveau du remodelage de la chromatine. Bien que le complexe DRIP potentialise la fonction de transactivation du VDR sur une matrice de chromatine (Rachez et al., 1999), les complexes TRAP / DRIP ne possèdent aucune activité acétyltransférase (Yuan et al., 1998).

De plus, le fait que le complexe TRAP stimule l'activation de la transcription par le TR en présence d'ADN linéaire (Fondell et al., 1996b; Fondell et al., 1999) suggère plutôt une influence directe sur l'appareil de transcription de base. La possibilité d'une fonction dans le recrutement de l'ARN polymérase II est renforcée par la démonstration d'une association directe entre le complexe Médiateur (l'homologue TRAP / DRIP de la levure) et l'ARN polymérase II (Myers and Kornberg, 2000).

#### 1.1.5.3 Les corépresseurs

La capacité des RAR et TR à réprimer la transcription en absence de leur ligand respectif ainsi que l'accumulation d'évidences démontrant que la dissociation d'un répresseur potentiel est essentielle à la fonction de transactivation de ces récepteurs (Perlmann and Vennstrom, 1995), a mené à la recherche de cofacteurs responsables de cet effet inhibiteur. L'utilisation de la technique du double-hybride a permis l'identification de deux protéines capables d'interagir avec les RAR et TR, soient N-CoR (Nuclear receptor CoRepressor) (Horlein et al., 1995; Kurokawa et al., 1995) et SMRT (Silencing Mediator of RAR and TR) (Chen and Evans, 1995). Dans les deux cas, l'absence de ligand stimule l'interaction avec les récepteurs alors que sa présence la prévient. Tel qu'attendu, N-CoR et SMRT possèdent une fonction de répression, dans la région amino-terminale de la protéine, transférable à un domaine de liaison à l'ADN hétérologue. Aussi, il a été démontré que ces deux cofacteurs sont essentiels à la répression par les RAR et TR en absence de leur ligand (Horlein et al., 1995; Zhang et al., 1998).

Initialement les études portant sur la détermination des mécanismes responsables de la répression par N-CoR et SMRT, suggéraient le recrutement des facteurs histone-désacétylases HDAC1 et HDAC2, via l'interaction avec les homologues murins (Sin3A et Sin3B) du corépresseur Sin3 de levure (Heinzel et al., 1997; Nagy et al., 1997). Des études génétiques faites chez la levure ont permis d'établir un lien entre la répression transcriptionnelle exercée par Sin3 et le facteur RPD3 (McKenzie et al., 1993; Stillman et al., 1994; Vidal et al., 1991; Vidal and Gaber, 1991), dont l'homologue est HDAC1 chez l'humain (Taunton et

al., 1996). Ces observations ont mené à la formulation de l'hypothèse qu'en absence de leur ligand, les récepteurs répriment la transcription par le recrutement du complexe Sin3-HDAC1 / 2 via leur interaction avec N-CoR ou SMRT. Toutefois la purification du complexe Sin3A a révélé la présence de plusieurs protéines, dont HDAC1 et HDAC2 mais pas celle de N-CoR ou SMRT (Zhang et al., 1997b). De plus, des études récentes ont démontré que HDAC4, HDAC5, HDAC6 et HDAC7 pouvaient interagir directement avec N-CoR et SMRT (Huang et al., 2000; Kao et al., 2000). Donc dans l'ensemble, ces données suggèrent l'existence de plusieurs voies, possiblement indépendantes de la présence de Sin3, contribuant à la répression de la transcription par les récepteurs nucléaires RAR et TR.

#### 1.1.5.4 Les répresseurs de la famille COUP-TF

Les membres de la famille COUP-TF sont des récepteurs nucléaires orphelins capables d'interférer avec les voies de signalisation de plusieurs récepteurs nucléaires, incluant celle de l'AR (Park et al., 2003). Chez les mammifères, deux gènes ont été identifiés: COUP-TFI (EAR3) et COUP-TFII (ARP-1). Tous deux forment des homodimères, ainsi que des hétérodimères avec RXR et certains autres récepteurs nucléaires. De plus, ces facteurs lient une grande variété d'éléments de réponse de type DR et palindromique. Ensemble, ces propriétés sont à l'origine de quatre mécanismes moléculaires utilisés pour réprimer la transcription des gènes cibles de plusieurs récepteurs nucléaires.

COUP-TFI / II reconnaît plusieurs éléments de réponse liés par d'autres récepteurs nucléaires et peut donc entrer en compétition avec ceux-ci pour la liaison au même site d'ADN. Ainsi, l'activation transcriptionnelle par les VDR, TR et RAR est inhibée par COUP-TFI / II (Cooney et al., 1993; Kliewer et al., 1992). Le fait que la répression peut être levée par la surexpression de RAR indique que COUP-TFI / II interfère avec la voie de signalisation de l'AR par la compétition avec son récepteur pour la liaison au RARE.

Étant donné la capacité du RXR à former des dimères fonctionnels avec plusieurs récepteurs nucléaires comme les VDR, TR et RAR, celui-ci est

considéré comme un partenaire d'hétérodimérisation universel (Mangelsdorf and Evans, 1995). COUP-TFI / II forme également des hétérodimères avec RXR sur l'ADN (Cooney et al., 1992; Kliewer et al., 1992; Tran et al., 1992). En diminuant ainsi la disponibilité de ce partenaire commun, COUP-TFI / II prévient son association avec d'autres récepteurs nucléaires et par conséquent, l'activation de la transcription de leurs gènes cibles. D'ailleurs, la surexpression de RXR entraîne l'activation de la transcription en présence de COUP-TFI / II (Cooney et al., 1993).

Comme dans le cas des RAR et TR, les membres de la famille COUP-TF sont capables de réprimer activement la transcription lorsque liés à un élément de réponse de type DR3, DR4 et DR5 (Cooney et al., 1992; Cooney et al., 1993). De manière intéressante COUP-TFI interagit directement avec N-CoR et SMRT, et l'expression de ces corépresseurs a pour effet de potentialiser la fonction de répression COUP-TFI (Shibata et al., 1997). Aussi, les résultats d'une autre étude démontrent que COUP-TFII réprime la transcription via son association directe avec HDAC1 (Smirnov et al., 2000). Il apparaît donc possible que les mécanismes impliqués dans le processus de répression active par COUP-TFI / II soient similaires à ceux responsables de la répression transcriptionnelle par les RAR et TR en absence de leur ligand.

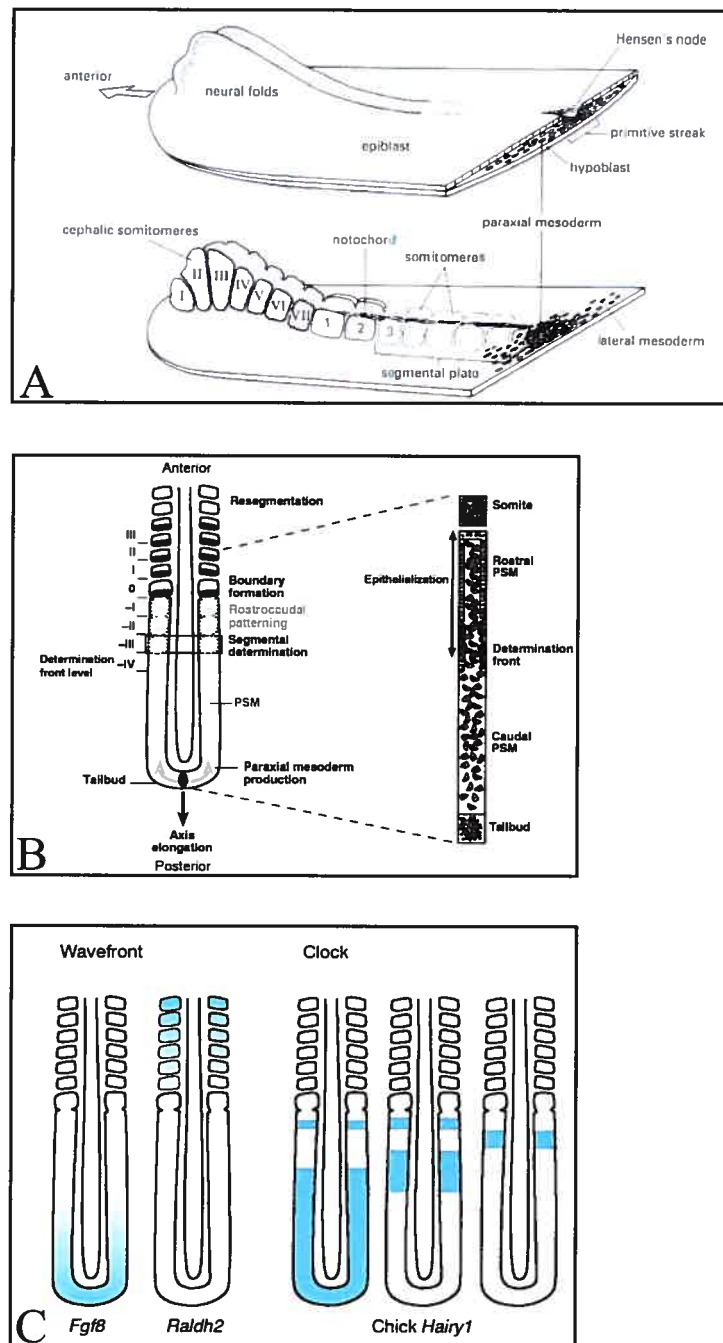
Enfin, une étude a permis d'établir que COUP-TFI pouvait également inhiber l'activation de la transcription par les RAR, TR et RXR en interagissant directement avec leur domaine de liaison au ligand (Leng et al., 1996). Ce mécanisme, connu sous le nom de transrépression, entraîne l'inhibition de l'activité transcriptionnelle induite par la liaison du ligand au récepteur, sans toutefois nécessiter la liaison de COUP-TFI à l'ADN.

## 1.2 Le développement vertébral

### 1.2.1 L'ébauche du squelette axial

Durant la gastrulation les mouvements morphogénétiques des cellules de l'épiblaste aboutissent à la mise en place des trois feuillets fondamentaux (l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme). Chez la souris, elle débute au jour E6.5 dans la partie postérieure de l'embryon avec la formation du nœud et de la ligne primitive, qui marque l'axe antéro-postérieur. Des études ont démontré que les premiers somites dérivent d'une population de précurseurs du mésoderme, localisée au niveau de la ligne primitive antérieure (Tam and Beddington, 1987; Tam, 1989). L'ingression des précurseurs dans le blastocoele (cavité entre l'épiblaste et l'hypoblaste) et leur migration latérale de chaque côté de l'axe antéro-postérieur résulte en la formation du mésoderme paraxial (Figure 1-3A). Étant donné que la somitogenèse suit une séquence rostro-caudale, la région antérieure du mésoderme paraxial est dite somitique (segmentée) et la région postérieure, présomitique (non-segmentée). Durant l'élongation de l'embryon, la ligne primitive régresse graduellement et à partir du jour E9 le bourgeon de la queue génère les précurseurs du mésoderme qui contribueront à la formation de tous les autres somites (Tam, 1984; Tam, 1986; Tam and Tan, 1992).

La somitogenèse initiée au jour E8 se poursuit jusqu'au jour E13.5 (Tam and Tan, 1992). Suite à leur différenciation, les somites matures sont constitués du sclérotome et du dermamyotome. Le sclérotome contribue à l'ébauche des vertèbres, des os de la région occipitale et des côtes, alors que le dermamyotome est à l'origine du derme et de la musculature du tronc et des membres. Le squelette axial de la souris est normalement composé de sept vertèbres cervicales (C1-C7), treize thoraciques (T1-T13), six lombaires (L1-L6), quatre sacrales (S1-S4) et d'une trentaine de vertèbres caudales. Ces vertèbres ne sont pas toutes identiques mais présentent une structure caractéristique de leur position dans l'axe



**Figure 1-3: La somitogenèse.** A) La formation du mésoderme paraxial. [Tiré de Hogan et al., 1994]. B) La localisation du front de détermination. C) La distribution des gènes qui influencent la progression du front de détermination (gauche). L'expression cyclique de *c-hairy1* (droite). [Tiré et modifié de Dubrulle et al., 2004].

antéro-postérieur. Par exemple, la première vertèbre cervicale (C1 ou atlas) se distingue par la présence d'un arc neural large et d'un tubercule ventral, appelé l'arc antérieur de l'atlas (AAA). L'arc neural de C2 n'est pas aussi large que celui de C1 mais l'est davantage que celui des vertèbres plus postérieures. Aussi, C6 possède une structure ventrale, nommée tubercule antérieur. Enfin les vertèbres thoraciques sont caractérisées par la présence de côtes, dont les sept premières sont rattachées au sternum.

### 1.2.2 La périodicité de la somitogenèse

La segmentation du mésoderme présomitique est périodique. Ainsi, la production d'une nouvelle paire de somite s'effectue à des intervalles réguliers (90 min chez le poulet et 120 min chez la souris). La caractérisation des mécanismes moléculaires qui contrôlent la périodicité de la somitogenèse a été grandement facilitée par l'identification d'oscillateurs moléculaires, dont l'expression suit une vague cyclique qui parcourt le mésoderme présomitique dans un mouvement caudo-rostral. Parmi ceux-ci, on retrouve *c-hairy1*, *c-hairy2*, *lunatic fringe* (*Lfng*), *deltaC*, *her1*, *her7*, *Hes1*, *Hes7* et *Hey2* (Aulehla and Herrmann, 2004; Iulianella et al., 2003). Étant donné que tous ces gènes sont impliqués dans la voie Notch, il a donc été suggéré que cette voie exerce un rôle important au niveau de la périodicité du processus de segmentation. La vague d'expression caudo-rostrale des oscillateurs n'est pas continue. Elle se stabilise lorsque les cellules immatures du mésoderme présomitique postérieur atteignent le futur point de segmentation, localisé dans la partie antérieure du mésoderme présomitique. Ce point constitue le front de détermination (Figure 1-3B). Sa position le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon est contrôlée par l'existence de deux gradients opposés impliquant la voie FGF et celle de l'AR (Figure 1-3C).

La distribution des transcrits *Fgf8* (et celle de la protéine correspondante) forme un gradient de concentration rostro-caudal dans le mésoderme présomitique (Dubrulle and Pourquie, 2004). La perturbation de ce gradient engendre des effets directs sur le processus de segmentation (Dubrulle et al., 2001). En effet, une augmentation locale de la concentration de la protéine FGF8 entraîne la formation

de somites plus petits. À l'opposé, l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité kinase des récepteurs FGF résulte en une augmentation de la taille des somites. Ainsi, toute altération du gradient FGF8 entraîne un déplacement du front de détermination et affecte le nombre de cellules incorporées dans chaque somite.

D'autre part, il existe un modèle hypothétique selon lequel la distribution des transcrits *Raldh2* et *Cyp26a* génère un gradient caudo-rosal d'AR dans l'embryon en développement. Certaines évidences suggèrent que ce gradient soit également impliqué dans le processus de segmentation. Notamment, il a été démontré que la taille des somites est réduite chez un modèle de caille déficient en vitamine A (Diez et al., 2003; Maden et al., 2000) ainsi que chez les souris *Raldh2*<sup>-/-</sup> (Niederreither et al., 1999). À l'inverse, la culture d'embryons en présence d'AR génère des somites plus gros chez *Xenopus* (Moreno and Kintner, 2004). L'ensemble de ces observations indique donc que l'AR exerce aussi une fonction dans la localisation du front de détermination.

De manière intéressante, des études ont permis d'établir l'existence d'un contrôle réciproque entre les gradients opposés de FGF8 et de l'AR. À cet effet, FGF8 semble inhiber la voie de l'AR en activant l'expression de *Cyp26a* (Moreno and Kintner, 2004) et en inhibant celle de *Raldh2* (Diez et al., 2003). Parallèlement, l'AR s'opposerait à la signalisation via FGF8 en inhibant l'expression de ces transcrits (Diez et al., 2003) et/ou en activant l'expression d'un inhibiteur de la voie FGF (Moreno and Kintner, 2004). En résumé ces résultats suggèrent que l'action opposée des gradients formés par FGF8 et l'AR contrôle la position du front de détermination. Le gradient FGF8 inhibe le processus de segmentation, alors que le gradient d'AR soulève l'inhibition en s'opposant à la voie FGF8.

Enfin, une étude récente révèle que la voie Wnt3a contrôle également le processus de segmentation (Aulehla et al., 2003). Une augmentation locale de la concentration de la protéine Wnt3a dans le mésoderme présomitique, engendre la formation de somites plus petits. Cette observation laisse donc supposer l'existence d'un gradient Wnt3a, capable aussi d'influencer la localisation du front de détermination. D'ailleurs, les résultats de cette étude démontrent que



*Axin2* (un régulateur négatif de la voie Wnt3a) est une cible directe de Wnt3a et que la distribution de ses transcrits forme un gradient rostro-caudal dans le mésoderme présomitique. De plus, il apparaît possible que la voie Wnt3a contrôle le gradient formé par FGF8 puisque l'expression de ses transcrits est diminuée chez les mutants homozygotes pour l'allèle hypomorphe Wnt3a (*vt/vt*).

Malgré le fait que l'inactivation de la voie Notch prévienne l'oscillation des gènes cycliques appartenant à cette voie (Jouve et al., 2000), elle n'empêche pas la formation des somites, bien que leur morphologie soit profondément altérée (Conlon et al., 1995). Cette observation a ensuite soulevé la possibilité de l'existence d'autres voies d'oscillation impliquées dans la segmentation. Une importante observation effectuée par Aulehla et ses collaborateurs (Aulehla et al., 2003) concerne l'identification du caractère oscillatoire de l'expression de *Axin2*. L'analyse du profil d'expression de *Lfng* et *Axin2* a aussi permis de démontrer que les voies Notch et Wnt3a sont alternativement actives dans le mésoderme présomitique. Enfin, les résultats présentés suggèrent que l'oscillation des gènes appartenant à la voie Notch dépende de la voie Wnt3a, puisque l'oscillation de l'expression de *Lfng* est complètement abolie chez les mutants *vt/vt*. Par contre, le caractère oscillatoire de l'expression de *Axin2* n'est pas perturbé chez les mutants *Dll1*<sup>-/-</sup>, dont la voie Notch est affectée.

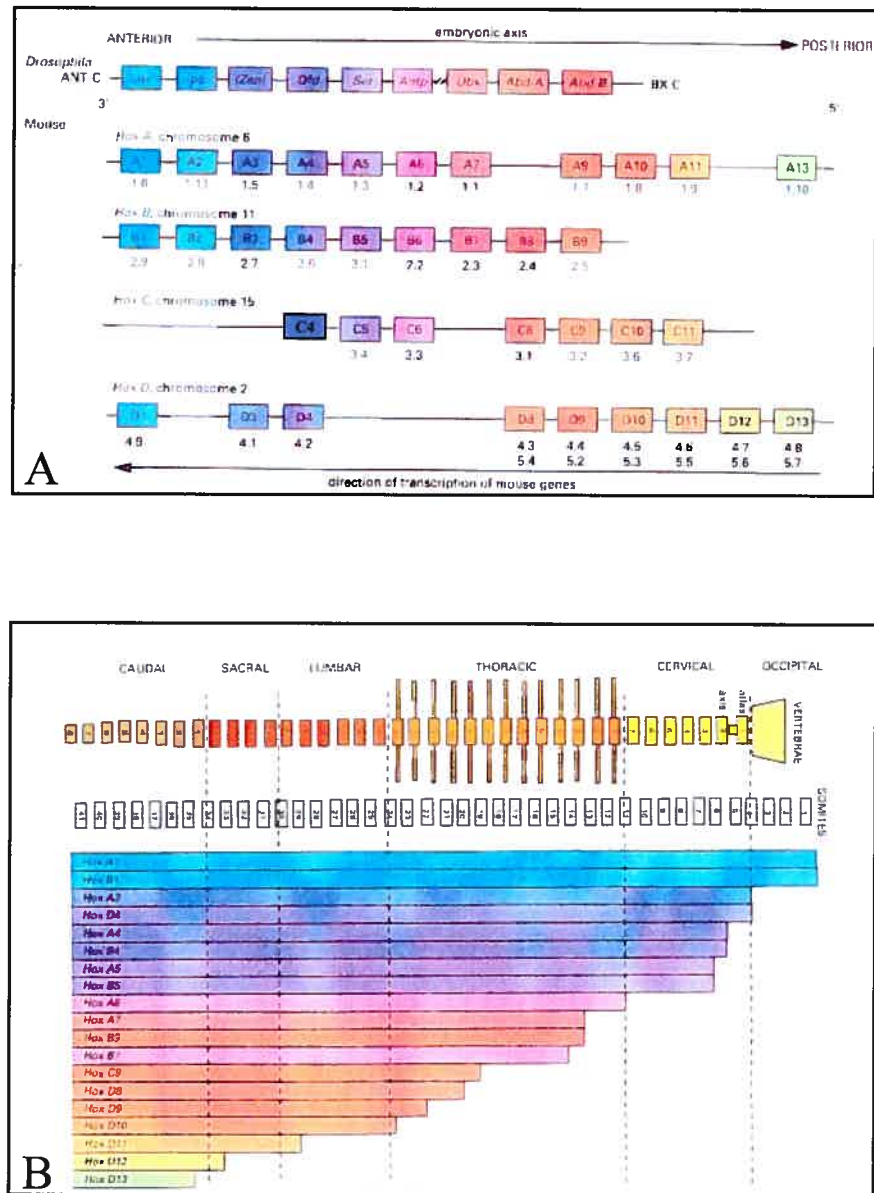
En résumé, les données disponibles à ce jour ont mené à l'élaboration d'un modèle selon lequel les oscillations moléculaires de la voie Notch et de la voie Wnt contrôlent la périodicité de la somitogenèse. D'autre part, l'expression des oscillateurs moléculaires est influencée par la présence de gradients de concentration. Selon le modèle proposé le front de détermination correspond au site à partir duquel la concentration de FGF8 et Wnt3a chute en dessous d'un seuil critique. Suite à l'élongation caudale de l'embryon, l'expression cyclique des oscillateurs moléculaires (dans les cellules immatures du mésoderme présomitique postérieur) se stabilise après l'atteinte du front de détermination. Enfin, le nombre de cellules incorporées dans chaque somite dépend du nombre de cellules qui traversent le front de détermination durant chaque cycle d'oscillation.

### 1.2.3 Les gènes Hox

#### 1.2.3.1 Le principe de colinéarité

Les gènes *Hox* encodent des facteurs de transcription dont la capacité à lier l'ADN est conférée par la présence d'un homéodomaine (Gehring, 1993). Chez l'humain et la souris, il existe 39 gènes *Hox* organisés en quatre complexes (A-D), localisés sur quatre chromosomes différents (Figure 1-4A) (Krumlauf, 1994). D'un point de vue évolutif, il apparaît probable que les complexes des vertébrés aient été générés par la duplication d'un complexe ancestral apparenté aux complexes HOM-C de *Drosophila mélanogaster* (Duboule and Dolle, 1989; Duboule, 1998; Ferrier and Holland, 2001). Ainsi les gènes occupant la même position sur des complexes différents possèdent une très grande homologie de séquence (dans l'homéodomaine), d'expression et de fonction. On réfère à l'ensemble de ces gènes sous le nom de « groupe paralogue », qui sont au nombre de treize chez les vertébrés. Le fait que les treize groupes paralogues ne soient pas tous représentés sur chaque complexe, suggère que certains gènes aient été perdus durant le processus de duplication.

Chez la souris, l'expression des gènes *Hox* débute au jour E7.5 dans les cellules de la ligne primitive (Deschamps and Wijgerde, 1993). Plus tard, les principaux domaines d'expression incluent le rhombencéphale, le mésoderme paraxial et le tube neural. Il existe une corrélation entre l'organisation physique des gènes *Hox* le long du chromosome et leur limite d'expression antérieure dans l'axe antéro-postérieur de l'embryon (Duboule and Dolle, 1989; Graham et al., 1989). Ce principe porte le nom de colinéarité spatiale. Une relation a également pu être établie entre le moment à partir duquel un gène *Hox* commence à être exprimé, et sa position génétique dans le complexe (Izpisua-Belmonte et al., 1991; Munke et al., 1986). C'est la colinéarité temporelle. Ensemble ces deux propriétés indiquent que les gènes à l'extrémité 3' de chaque complexe sont activés plus tôt dans le développement et possèdent une limite d'expression plus antérieure que ceux de la région 5'.



**Figure 1-4: Les gènes Hox.** A) L'organisation génomique des gènes Hox des vertébrés. B) Diagramme illustrant le principe du code Hox. [Tiré et modifié de Hogan et al., 1994].

Malgré le fait que les somites apparaissent comme des structures identiques alignées en série, chaque somite est à l'origine d'un segment vertébral différent, dont l'identité reflète sa position dans l'axe antéro-postérieur. À cause de la colinéarité spatiale, la combinaison de gènes *Hox* exprimés par les cellules d'un segment (le code *Hox*; Figure 1-4B) permet de définir son identité (Kessel and Gruss, 1991). Initialement les complexes *Hox* sont organisés sous la forme d'hétérochromatine, prévenant ainsi leur expression. Les facteurs de la famille Pc-G (Polycomb-Group) contribuent à la régulation négative de la transcription des gènes *Hox*, par la modification de la structure de la chromatine (Gebuhr et al., 2000; Gould, 1997; Simon and Tamkun, 2002). Il semble qu'en maintenant la chromatine dans un état fermé, Pc-G puisse contrôler le caractère temporel de l'activation des gènes *Hox*. D'ailleurs, les souris homozygotes pour la mutation de M33, un membre la famille Pc-G, présentent une activation prématurée de certains gènes *Hox* (Bel-Vialar et al., 2000). Suite à l'ouverture progressive des complexes *Hox*, les gènes sont libérés de l'influence répressive et deviennent successivement accessibles pour la transcription (Kondo and Duboule, 1999).

Il a été suggéré que l'identité axiale soit une propriété intrinsèque des cellules du mésoderme présomitique, acquise durant la gastrulation (Kieny et al., 1972; Nowicki and Burke, 2000). Selon ce modèle, les cellules du mésoderme paraxial destinées à former les somites de la région cervicale formeront tout de même une vertèbre cervicale, même lorsque transplantées au niveau axial des cellules destinées à former les somites de la région thoracique. D'ailleurs ces somites expriment la même combinaison de gènes *Hox* qui caractérise l'identité cervicale. Ainsi, l'identité des cellules du mésoderme paraxial serait spécifiée dès leur entrée dans le mésoderme présomitique. Toutefois les résultats d'une étude récente révèlent que la combinaison définitive de gènes *Hox* exprimés par les cellules du mésoderme présomitique, est acquise au front de détermination (Dubrulle et al., 2001). Tant que les cellules n'ont pas atteint cette limite, leur identité peut être modifiée par des signaux locaux. De ce fait, l'augmentation du nombre d'oscillations subies par les cellules du mésoderme présomitique, via une exposition à des concentrations de FGF8 supérieures à celles rencontrées au front

de détermination, entraîne une postériorisation de l'identité axiale. Ces observations indiquent que l'activation spatio-temporelle des gènes *Hox* est sous le contrôle du processus de segmentation. À cet effet, il a été démontré que l'expression des gènes *Hox* est dynamique dans la partie antérieure du mésoderme présomitique (Zakany et al., 2001). De plus, l'activation de certains gènes *Hox* semble dépendre de la voie Notch puisque l'inactivation de RBPJk, un effecteur de cette voie, réduit considérablement leur expression dans le mésoderme présomitique. D'ailleurs, une étude récente révèle que l'inhibition de la voie Notch, ainsi qu'une perturbation de l'expression cyclique de *Lfng* dans le mésoderme paraxial, se traduit par un phénotype où l'identité vertébrale est altérée (Cordes et al., 2004).

#### 1.2.3.2 La spécification de l'identité vertébrale

Le rôle des gènes *Hox* dans le développement a d'abord été démontré par l'identification de mutations génétiques chez la mouche, pouvant causer des transformations homéotiques. Le génome de *Drosophila melanogaster* compte huit gènes homéotiques répartis sur deux complexes (HOM-C): Bithorax (BX-C) et Antennapedia (ANT-C) (McGinnis and Krumlauf, 1992). Un exemple classique de transformation homéotique est celui de la mutation qui affecte l'expression du gène *Antp*, et qui résulte en la formation de pattes à la place d'antennes (Frischer et al., 1986). Avec l'avancement des techniques de manipulation génétique chez la souris, plusieurs études ont permis de démontrer que les gènes *Hox* des vertébrés sont aussi de véritables complexes homéotiques (Krumlauf, 1994). L'expression ectopique d'un gène *Hox* dans une région antérieure à sa limite d'expression normale génère des transformations homéotiques vertébrales postérieures (Lufkin et al., 1992; McLain et al., 1992). À l'opposé, l'inactivation des gènes *Hox* entraîne généralement des transformations homéotiques vertébrales antérieures, affectant la (les) structure(s) située(s) à la limite d'expression antérieure du gène inactivé (Duboule, 1991). C'est le modèle de prévalence postérieure. Selon celui-ci, les gènes ayant une limite d'expression plus postérieure exercent une fonction dominante dans la spécification de l'identité par

rapport aux autres gènes exprimés dans la même région mais dont la limite d'expression est plus antérieure.

Le gène *Hoxd4* de la souris est le premier gène *Hox* du complexe D à avoir été cloné (Featherstone et al., 1988). Il a été démontré que son inactivation entraîne des transformations homéotiques vertébrales antérieures (Horan et al., 1995a). Tel que mentionné précédemment, l'atlas est la seule vertèbre à posséder l'AAA. Toutefois, chez les souris homozygotes et hétérozygotes pour la mutation de *Hoxd4*, C2 développe un AAA ectopique. Ces résultats indiquent donc que *Hoxd4* joue un rôle important dans l'établissement de l'identité régionale de la deuxième vertèbre cervicale. Par contre, la pénétrance associée à ce phénotype est incomplète (33% chez les homozygotes et 10% chez les hétérozygotes). Les autres anomalies détectées incluent la malformation de l'arc neural des vertèbres C1, C2 et C3 ainsi qu'une mauvaise ossification de l'os basioccipital du crâne. Parmi les gènes *Hox* du groupe paralogue 4, *Hoxb4* et *Hoxd4* partagent la même limite d'expression antérieure, correspondant à la paire de somites qui formera la première vertèbre cervicale (Gaunt et al., 1989; Geadia et al., 1992). À cet effet, il est intéressant de noter que les mutants *Hoxb4*<sup>-/-</sup> manifestent aussi la présence d'un AAA ectopique en C2 dont la pénétrance est incomplète (33%) (Ramirez-Solis et al., 1993). Par ailleurs, ces mutants présentent une altération de la morphogenèse du sternum ainsi qu'une diminution du taux de survie. La possibilité d'une redondance fonctionnelle quant à l'établissement de l'identité de C2 a par la suite été envisagée et confirmée par la génération de double-mutants *Hoxb4*<sup>-/-</sup> / *Hoxd4*<sup>-/-</sup> (Horan et al., 1995b). En effet, les résultats de cette étude montrent que chez les double-mutants, la transformation C2 en C1 est complètement pénétrante. Ainsi, les gènes *Hox* d'un même groupe paralogue semblent exercer des fonctions uniques et redondantes.

#### 1.2.3.3 La régulation de l'expression des gènes *Hox* par l'acide rétinoïque

La culture de cellules de carcinomes embryonnaires a d'abord permis de déterminer que l'expression des gènes *Hox* est induite par l'AR et qu'il existe une corrélation entre la position des gènes dans le complexe et leur sensibilité à l'AR

(Breier et al., 1986; Simeone et al., 1990). Les gènes *Hox* de la région 3' répondent à des concentrations plus faibles d'AR et sont donc plus sensibles que ceux de la région 5'. *In vivo* l'administration maternelle d'AR durant les premières étapes de la gastrulation affecte l'expression des gènes *Hox* dans les tissus dérivés du neurectoderme et du mésoderme paraxial (Conlon and Rossant, 1992; Kessel and Gruss, 1991; Kessel, 1992). D'ailleurs les transformations homéotiques postérieures induites par l'excès d'AR sont associées à une antériorisation de la limite d'expression antérieure de certains gènes *Hox*. Ainsi ces résultats suggèrent que l'AR régule l'expression des gènes *Hox*, dont la combinaison dicte l'identité vertébrale. D'autres évidences en faveur de ce modèle proviennent de l'analyse des mutants générés par l'inactivation de gènes impliqués dans le métabolisme de l'AR ou dans la transduction de son signal. Par exemple, les souris *Cyp26a1*<sup>-/-</sup> présentent des transformations homéotiques postérieures associées à une altération du profil d'expression des gènes *Hox* (Abu-Abed et al., 2001). Des transformations homéotiques antérieures, accompagnées d'une postériorisation de la limite d'expression antérieure de certains gènes *Hox*, ont aussi été observées au niveau du squelette axial et du rhombencéphale de différents mutants RAR (Dupe et al., 1999; Lohnes et al., 1993; Lohnes et al., 1995; Wendling et al., 2001). Toutes ces observations, en plus du fait que les mutants *RAR*<sup>-/-</sup>, *Hoxb4*<sup>-/-</sup> et *Hoxd4*<sup>-/-</sup> partagent le phénotype de transformation C2 en C1, suggèrent que l'AR contrôle la spécification de l'identité positionnelle dans le mésoderme et le neurectoderme via la régulation de l'expression des gènes *Hox*. D'ailleurs, des RARE fonctionnels ont été identifiés dans le promoteur de plusieurs gènes *Hox*: *Hoxa1* (Frasch et al., 1995; Langston and Gudas, 1992), *Hoxb1* (Huang et al., 1998; Marshall et al., 1994; Studer et al., 1994), *Hoxa4* (Packer et al., 1998), *Hoxb4* (Gould et al., 1998), *Hoxd4* (Morrison et al., 1996; Popperl and Featherstone, 1993; Zhang et al., 1997a). Toutefois, les résultats de plusieurs études ont révélé que ces RARE sont essentiels à l'expression des gènes *Hox* dans le rhombencéphale (Gavalas et al., 1998; Marshall et al., 1996; Nolte et al., 2003). Jusqu'à ce jour, aucun RARE indispensable pour l'expression des

gènes *Hox* dans le mésoderme paraxial n'a été identifié, suggérant l'existence de facteurs intermédiaires.

### 1.3 Les membres de la famille *Cdx*

#### 1.3.1 L'origine des gènes *Cdx*

Le gène *caudal* (*cad*) de *Drosophila* est le premier membre de la famille des facteurs de transcription à boîte homéo de type caudal (*Cdx*) à avoir été identifié (Mlodzik et al., 1985; Mlodzik and Gehring, 1987). Les premiers transcrits détectés sont d'origine maternelle et forment un gradient rostro-caudal dans l'embryon. Plus tard dans le développement, les transcrits maternels sont remplacés par ceux du zygote, qui s'accumulent aussi dans le pôle postérieur. *cad* est impliqué dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur ainsi que dans le processus de segmentation du blastoderme postérieur (Macdonald and Struhl, 1986). De plus, une étude a permis d'établir que *cad* est essentiel à la spécification de l'identité du dernier segment abdominal (A10) (Moreno and Morata, 1999). En effet, l'inactivation de *cad* entraîne une transformation homéotique du segment A10 vers une identité plus antérieure, correspondant à celle du segment A9. Ainsi, bien que le gène *cad* ne soit pas compris dans les complexes HOM-C, et que par conséquent il ne soit pas considéré comme un gène *Hox*, sa fonction dans le développement est analogue à celle exercée par ce groupe de gènes.

Chez *Amphioxus* l'homologue *AmphiCdx* est compris dans un complexe appelé *ParaHox*, aussi constitué des gènes à boîte homéo *AmphiXlox* (*Pdx1* chez la souris) et *AmphiGsx* (*Gsh1* et *Gsh2* chez la souris). Comme dans le cas des complexes *Hox*, il semble que le complexe *ParaHox* des vertébrés ait subi une série de duplications menant à la formation de quatre complexes *ParaHox* (Pollard and Holland, 2000). Il a d'ailleurs été suggéré que les complexes *Hox* et *ParaHox* aient été générés à partir de la duplication d'un complexe ancestral, nommé *ProtoHox* (Brooke et al., 1998). Ainsi, cette observation est en accord



avec le fait que les gènes *Hox* et *Cdx* exercent des fonctions similaires dans le développement, bien que localisés sur des complexes différents.

Plusieurs gènes *Cdx* apparentés au gène *cad* ont ensuite été identifiés dans divers organismes. Chez les vertébrés, trois gènes *Cdx* ont été caractérisés: *Cdx1* (Duprey et al., 1988), *Cdx2* (James and Kazenwadel, 1991) et *Cdx4* (Gamer and Wright, 1993) chez la souris, *CdxA* (Frumkin et al., 1991), *CdxB* (Serrano et al., 1993) et *CdxC* (Marom et al., 1997) chez le poulet et *Xcad1*, *Xcad2* (Blumberg et al., 1991) et *Xcad3* (Northrop and Kimelman, 1994) chez *Xenopus laevis*.

### 1.3.2 Les profils d'expression

Chez la souris, l'expression de *Cdx1* débute au jour E7.5 dans les cellules ectodermes et mésodermes de la ligne primitive (Meyer and Gruss, 1993). Au jour E8 les transcrits s'accumulent dans le mésoderme postérieur, où ils demeureront exprimés jusqu'à l'extinction complète de *Cdx1* dans ce tissu (E12). L'expression est aussi détectée dans les cellules du neurectoderme, avec une limite d'expression antérieure correspondant au futur rhombencéphale. Pendant l'élongation rostro-caudale de l'embryon, cette limite régresse postérieurement jusqu'au jour E9.5, où elle atteint la partie caudale du tube neural. À partir du jour E8.5, les transcrits *Cdx1* sont aussi détectés dans le mésoderme paraxial et les somites, où l'expression sera limitée au dermamyotome dès E9.5. Les autres sites d'expression incluent les cellules mésenchymales des bourgeons des membres antérieures et postérieures ainsi que le mésonéphros. Enfin l'expression de *Cdx1*, dans les structures dérivées de l'ectoderme et du mésoderme, cesse au jour E12. Plus tard durant l'embryogénèse (E14), l'expression de *Cdx1* est spécifiquement activée dans les cellules épithéliales de l'intestin en développement (Duprey et al., 1988). Son expression dans ce tissu est d'ailleurs maintenue chez l'adulte. Donc dans l'ensemble ces données révèlent que l'expression de *Cdx1* est biphasique : La première phase est précoce (E7.5-12) et spécifique aux cellules d'origine mésodermale et ectodermale, alors que la deuxième est tardive (à partir de E14-) et spécifique à l'endoderme viscéral.

L'expression de *Cdx2* est d'abord détectée (E3.5) dans le trophoctoderme du blastocyste (Beck et al., 1995). Ce groupe de cellules ne produit aucune structure embryonnaire mais forme le chorion, la portion du placenta qui entre en contact avec l'embryon. À ce stade *Cdx2* n'est pas exprimé au niveau de la masse cellulaire interne. Ce n'est qu'un jour après le début de l'expression de *Cdx1* que *Cdx2* commence à être exprimé. Ainsi au jour E8.5, les transcrits *Cdx2* sont détectés dans la partie caudale du tube neural, dans l'épithélium de l'endoderme viscéral postérieur ainsi que dans le mésoderme présomitique. À partir de E12.5 et jusqu'à l'âge adulte, son expression est restreinte à l'épithélium de l'intestin. Contrairement à *Cdx1*, les transcrits *Cdx2* ne sont jamais détectés dans les somites, les bourgeons des membres et le mésoderme intermédiaire.

Enfin, le profil d'expression correspondant à *Cdx4* a aussi été décrit (Gamer and Wright, 1993). Les premiers transcrits sont détectés au jour E7 au niveau de l'allantois et de la ligne primitive postérieure. Ensuite, les niveaux d'expression augmentent dans toutes les cellules de la partie caudale de l'embryon. *Cdx4* est alors exprimé dans le neurectoderme, le mésoderme paraxial et l'endoderme viscéral postérieur. Il est à noter que la limite d'expression antérieure dans le mésoderme présomitique et le tube neural, est légèrement postérieure à celle observée pour *Cdx2*. À partir du jour E10, les transcrits *Cdx4* ne sont plus détectés.

Les profils d'expression spatiotemporels des trois gènes *Cdx* se chevauchent largement dans le mésoderme et le neurectoderme durant la gastrulation, et coïncident avec l'activation des gènes *Hox* le long de l'axe antéro-postérieur. Ces observations ont amené plusieurs groupes à formuler l'hypothèse que les facteurs *Cdx* soient impliqués dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur (Beck et al., 1995; Gamer and Wright, 1993; Meyer and Gruss, 1993).

### 1.3.3 Le phénotype des mutants *Cdx*

Dans le but d'établir le rôle de *Cdx1* durant le développement embryonnaire, le gène correspondant a été inactivé par recombinaison homologue (Subramanian et al., 1995). Les mutants homozygotes générés sont viables et fertiles mais

présentent des transformations homéotiques du squelette axial. Dans la majorité des cas, l'atlas est fusionné à l'os basioccipital, la taille de son arc neural est diminuée et l'AAA ne se développe pas. De plus, les vertèbres C2, C3, C6 et C7 adoptent l'identité de la vertèbre qui la précède dans l'axe antéro-postérieur. Tel que mentionné auparavant, les côtes des sept premières vertèbres thoraciques sont rattachées au sternum. Malgré le fait que la plupart des mutants *Cdx1*<sup>-/-</sup> forment une paire de côtes sur la huitième vertèbre (V8, aussi appelée T1), celle-ci adopte plusieurs caractéristiques propres à C7. Chez plusieurs mutants on observe aussi une fusion entre la première et la deuxième côte de même que la présence d'une huitième paire de côte rattachées au sternum. Donc dans l'ensemble, ces résultats démontrent que l'inactivation de *Cdx1* entraîne des transformations homéotiques vertébrales antérieures affectant les vertèbres C1 à T8.

Les résultats obtenus par une autre étude démontrent l'importance des niveaux d'expression de *Cdx1* dans le développement normal des structures antérieures du squelette axial (Allan et al., 2001). En effet, chez les souris hétérozygotes pour la mutation de *Cdx1*, C2 adopte souvent certaines caractéristiques de C1, incluant la présence d'un AAA et l'élargissement de son arc neural. Parmi les autres anomalies détectées, on note la fusion entre l'AAA de C1 et l'os basioccipital, la malformation de l'arc neural de C1 et C2 ainsi que la fusion entre l'arc neural de C2 et C3. Étant donné que les vertèbres postérieures à C3 ne sont pas affectées chez les souris *Cdx*<sup>+/-</sup>, il apparaît donc possible que les structures vertébrales antérieures soient plus sensibles à un changement dans les niveaux d'expression de *Cdx1*.

Le phénotype lié à l'inactivation de *Cdx2* a aussi été décrit (Chawengsaksophak et al., 1997). La mutation qui affecte l'expression de *Cdx2* à l'état homozygote, entraîne la mort de l'embryon au moment de l'implantation (E3.5-E5.5). Une étude récente révèle d'ailleurs que l'incapacité d'implantation résulte du développement anormal du trophoblaste, où *Cdx2* est normalement exprimé à ce stade (Chawengsaksophak et al., 2004). Par ailleurs, les souris hétérozygotes pour la mutation de *Cdx2* présentent des transformations homéotiques vertébrales antérieures comparables à celles observées dans le cas

des mutants *Cdx1*<sup>-/-</sup>. Toutefois, ces transformations affectent la structure des vertèbres C6 à T8. Cette différence s'explique probablement par le fait que *Cdx1* est exprimé plus tôt dans le développement, et possède une limite d'expression plus antérieure dans le mésoderme présomitique par rapport à *Cdx2*.

La possibilité d'une redondance fonctionnelle entre *Cdx1* et *Cdx2* a ensuite été examinée par l'étude du phénotype associé aux double-mutants *Cdx1* / *Cdx2* (van Den et al., 2002). D'une manière générale, les transformations homéotiques vertébrales observées sont beaucoup plus sévères chez les double-mutants *Cdx1*<sup>+/-</sup> *Cdx2*<sup>+/-</sup> que chez les simple-mutants hétérozygotes correspondants. Aussi, la fréquence de ces transformations chez les double-hétérozygotes est supérieure à la somme des fréquences observées pour chacun des simple-hétérozygotes. Cet effet de synergie suggère l'existence d'une redondance entre *Cdx1* et *Cdx2*. Par contre le fait que les transformations cervicales se manifestent à une fréquence plus élevée chez les mutants *Cdx1*<sup>-/-</sup> par rapport aux double-mutants *Cdx1*<sup>+/-</sup> *Cdx2*<sup>+/-</sup>, démontre que *Cdx1* exerce une fonction prépondérante dans le développement des vertèbres de cette région. Néanmoins, la participation de *Cdx2* à ce processus n'est pas négligeable si on considère que les anomalies qui affectent les quatre premières vertèbres cervicales sont beaucoup plus sévères chez les mutants *Cdx1*<sup>-/-</sup> *Cdx2*<sup>+/-</sup>, lorsque comparées à celles observées chez les souris *Cdx1*<sup>-/-</sup>. En bref, ces résultats indiquent également l'existence d'une certaine coopération, où la contribution de chaque gène peut varier.

La description du phénotype associé à l'inactivation du gène *Cdx4* n'a pas encore été rapportée. La difficulté rencontrée dans la génération d'un tel mutant résulte probablement de la localisation du gène dans la région du centre d'inactivation du chromosome X de la souris (Horn and Ashworth, 1995). Par contre, plusieurs évidences suggèrent que *Cdx4* soit impliqué dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur ainsi que dans le développement postérieur de l'embryon (Isaacs et al., 1998; Pownall et al., 1996). Notamment, il a été démontré que l'expression ectopique de *Xcad3*, l'homologue de *Cdx4* chez *Xenopus*, entraîne une troncation des structures antérieures. De plus, la

surexpression d'un mutant *Xcad3*, capable d'inhiber l'activité endogène du facteur *Xcad3*, inhibe le développement du tronc et de la queue. Enfin une étude récente, effectuée chez le poisson zèbre, a permis d'établir que les anomalies du développement axial et caudal observées chez le mutant *kugelig* (*kgg*), résultent d'une mutation dans le locus du gène *cdx4* (Davidson et al., 2003). D'ailleurs, une diminution du niveau des transcrits *cdx4*, médiée par l'injection d'embryons avec un oligonucléotide morpholino, entraîne un phénotype similaire à celui des mutants *kgg*.

#### 1.3.4 Cdx contrôle l'expression des gènes *Hox*

L'accumulation de plusieurs évidences a permis d'établir que Cdx influence le développement vertébral par la régulation directe de l'expression de certains gènes *Hox*. En tant que facteurs transcriptionnels, les membres de la famille Cdx contrôlent la transcription en liant leur élément de réponse (CDXRE) dans le promoteur des gènes cibles. Des essais de liaison *in vitro* ont mené à l'identification d'une séquence consensus reconnue par *CdxA* et correspondant à A / CTTTATA / G (Margalit et al., 1993). Depuis, divers groupes ont rapporté la présence de CDXRE dans les séquences régulatrices de nombreux gènes *Hox* (Charite et al., 1998; Subramanian et al., 1995). D'ailleurs, *Cdx1* active la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle de 470 paires de base du promoteur de *Hoxa7* en culture cellulaire. Cette séquence contient deux CDXRE potentiels et la délétion d'une région incluant un de ces CDXRE, réduit l'activation de moitié. Il est intéressant de noter qu'une autre étude a démontré que cette portion du promoteur est suffisante pour établir la limite d'expression antérieure de *Hoxa7* (Knittel et al., 1995). Parallèlement, l'analyse de souris transgéniques révèle que les CDXRE du promoteur de *Hoxb8* sont essentiels à la distribution appropriée de ses transcrits (Charite et al., 1998). Aussi, l'expression ectopique des gènes *Cdx* dans les cellules du mésoderme et du neur ectoderme au jour E8.5, entraîne une antériorisation de la limite d'expression de *Hoxb8*.

Une autre évidence permettant de renforcer le rôle des gènes *Cdx* dans le contrôle de l'expression des gènes *Hox* provient de l'étude des simple- et double-

mutants pour *Cdx1* et *Cdx2* (Subramanian et al., 1995; van Den et al., 2002). En effet, les transformations homéotiques vertébrales antérieures observées chez ces mutants sont associées à une postériorisation de la limite d'expression antérieure d'un certain nombre de gènes *Hox* dans le mésoderme. Par exemple, le développement des vertèbres T1 et T2 est affecté chez les simple et double-mutants pour *Cdx1* et *Cdx2*. C'est d'ailleurs aussi le cas pour les mutants *Hoxb8* (van Den et al., 1999). Normalement, la limite d'expression antérieure de *Hoxb8* correspond à l'emplacement de la future T1. Toutefois, la mutation qui affecte l'expression de *Cdx1* et / ou *Cdx2* résulte en une postériorisation de la limite d'expression de *Hoxb8* pouvant atteindre le niveau de la future T3. Donc *Cdx1* et *Cdx2* sont impliqués dans l'établissement de la limite d'expression antérieure de *Hoxb8*. Ce n'est toutefois pas le cas pour *Hoxd4*, dont la limite d'expression est postériorisée chez les souris *Cdx1*<sup>-/-</sup> et les double-mutants, mais pas chez les souris hétérozygotes pour la mutation de *Cdx2*. Ces résultats sont en accord avec le fait que la transformation C2 en C1 observée chez les mutants *Hoxd4* soit phénotypée par les mutants *Cdx1* mais non par les mutants *Cdx2*. Ainsi, la présence de ce phénotype chez les double-mutants est le reflet du rôle prédominant exercé par *Cdx1* dans l'établissement du profil d'expression de *Hoxd4*. Enfin, les études utilisant *Xenopus* comme modèle indiquent également une fonction pour *Xcad3* dans la spécification de l'identité axiale via la régulation de l'expression des gènes *Hox* (Isaacs et al., 1998; Pownall et al., 1996).

### 1.3.5 La régulation transcriptionnelle de *Cdx1*

#### 1.3.5.1 *Cdx1* est une cible directe de l'acide rétinoïque

Tel que mentionné auparavant, la régulation de l'expression des gènes *Hox* par l'AR dans le mésoderme présomitique semble relever d'un mécanisme indirect. Les observations décrites dans la section précédente, ajoutées au fait que le phénotype vertébral des souris *Cdx1*<sup>-/-</sup> soit similaire à celui des double-mutants *RARα1γ*, suggèrent que *Cdx1* soit un facteur intermédiaire relayant le signal de l'AR sur le promoteur des gènes *Hox* dans le mésoderme présomitique.

La distribution de l'AR chevauche celle des transcrits *Cdx1* dans la ligne primitive de l'embryon au jour E7.5, suggérant que l'AR puisse réguler l'expression de *Cdx1*. À cet effet, notre laboratoire a démontré que *Cdx1* est une cible directe de l'AR (Houle et al., 2000). L'expression de *Cdx1* est induite suite à l'exposition à l'AR *in utero* entre E7.5 et E9.5, et diminuée chez les double-mutants  $RAR\alpha1\gamma$  au jour E7.5. De plus, une lignée cellulaire stable, ayant intégré un gène rapporteur sous le contrôle de 2Kb des séquences régulatrices de la portion 5' du promoteur de *Cdx1*, répond à de faibles concentrations d'AR. Pourtant, cette région ne contient aucun motif RARE typiquement reconnu par l'hétérodimère RXR-RAR. L'identification subséquente du motif lié spécifiquement par l'hétérodimère et responsable de la transactivation par l'AR, révèle que celui-ci possède une grande homologie de séquence avec l'élément de réponse à l'hormone thyroïdienne (TRE palindromique), présent dans le promoteur de l'hormone de croissance du rat. D'ailleurs, une étude a démontré que cet élément répond à l'AR (Umesono et al., 1988). De plus, le fait que le RARE atypique de *Cdx1* soit également conservé chez l'humain suggère que cet élément exerce un rôle important dans la régulation de l'expression.

Le rôle du RARE de *Cdx1* a ensuite été examiné *in vivo*, par la génération de mutants chez qui cet élément a été inactivé (Houle et al., 2003). Bien que l'inactivation du RARE n'empêche pas l'initiation de l'expression de *Cdx1* au jour E7.5, les niveaux détectés sont beaucoup plus faibles que ceux observés chez les souris sauvages. L'analyse des mutants à des stades ultérieurs indique une diminution encore plus prononcée des transcrits détectés. Ces données révèlent donc l'importance du RARE dans l'établissement des niveaux d'expression de *Cdx1*. Par ailleurs, les résultats de cette étude démontrent aussi que l'expression de *Cdx1* peut tout de même être induite par l'AR chez ces mutants. Le traitement d'embryons en culture avec un inhibiteur de la synthèse de protéines (cycloheximide) n'affecte cependant pas la réponse à l'AR. Ces données suggèrent donc l'existence d'une autre voie permettant l'induction de l'expression de *Cdx1* par l'AR (indépendamment de la synthèse de protéines *de novo*) et écartent la possibilité d'une régulation indirecte par d'autres facteurs induits par

l'AR. L'hypothèse envisagée implique plutôt l'existence d'un autre RARE capable de traduire les effets de l'AR sur le promoteur de *Cdx1 in vivo*. À ce sujet un motif RARE de type DR2 a été identifié dans le premier intron de la séquence génomique de *Cdx1* chez le poulet et la souris (Gaunt et al., 2003). S'il est véritable, ce mécanisme permettrait également d'expliquer les résultats d'une autre étude qui révèle que la mutation du RARE prévient l'expression mésodermale d'un transgène, sous le contrôle de séquences régulatrices de *Cdx1*, au jour E7.5 (Lickert and Kemler, 2002).

Les souris homozygotes pour la mutation du RARE de *Cdx1* présentent des transformations homéotiques antérieures ainsi que d'autres malformations vertébrales. Parmi celles-ci, on retrouve des transformations partielles de C2 en C1, caractérisées par l'élargissement de l'arc neural de C2 ou par la présence d'un AAA ectopique. En outre, la taille de l'arc neural de C1 est parfois réduite et son AAA fusionné à l'os basioccipital. L'analyse des mutants révèle aussi que ces transformations sont associées à une postériorisation de l'expression *Hoxb4* et de *Hoxd4*. Cette altération du profil d'expression des gènes *Hox* s'accorde avec le phénotype vertébral observé chez les mutants RARE, puisque les anomalies vertébrales détectées sont semblables à celles recensées chez les mutants *Hoxb4* et *Hoxd4*. D'autre part, il est à noter que contrairement aux mutants *Cdx1*<sup>-/-</sup>, les transformations homéotiques observées chez les mutants RARE affectent rarement les vertèbres postérieures à C2. Cette observation suggère donc que le RARE soit uniquement requis pour l'exercice de la fonction initiale (précoce) de *Cdx1*.

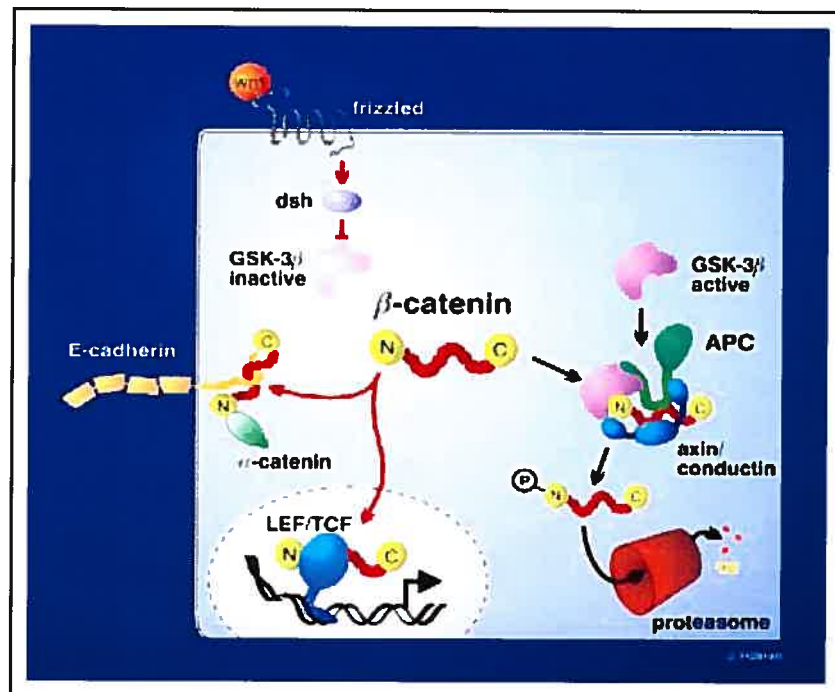
#### 1.3.5.2 La voie de signalisation Wnt

Les résultats décrits dans la section précédente soulignent l'importance de l'AR dans le contrôle de l'expression de *Cdx1* au jour E7.5. Cependant, les niveaux d'expression de *Cdx1* chez les mutants *RAR $\alpha$ 1 $\gamma$*  sont comparables à ceux observés pour les souris sauvages au jour E8.5 (Houle et al., 2000). Ces données s'accordent avec le fait que l'AR soit absent de la région de la ligne primitive à ce stade (Rossant et al., 1991). Par conséquent, il apparaît possible que l'AR soit



impliqué dans la phase d'initiation de l'expression de *Cdx1* et que d'autres facteurs contribuent à son maintien à des stades ultérieurs. L'accumulation de plusieurs évidences favorise l'implication des membres de la famille Wnt dans l'exercice de cette fonction.

Les ligands Wnt (Wingless) sont des glycoprotéines sécrétées qui régulent les niveaux cellulaires de  $\beta$ -catenin via la liaison aux récepteurs membranaires de la famille Frizzled (Figure 1-5). En absence de stimulation,  $\beta$ -catenin est déstabilisé par la formation d'un complexe cytoplasmique entre Axin, GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) et APC (Adenomatous Polyposis Coli). Dans ce complexe Axin interagit avec GSK3, APC et  $\beta$ -catenin, facilitant ainsi la phosphorylation de  $\beta$ -catenin par GSK3 (Ikeda et al., 1998).  $\beta$ -catenin est ensuite ubiquitiné et dégradé par la voie du protéasome (Aberle et al., 1997). Lorsque les cellules sont stimulées par un ligand Wnt, la protéine cytoplasmique Dsh (Dishevelled) est recrutée à la membrane (Axelrod et al., 1998; Boutros et al., 2000). Le mécanisme d'action de Dsh dans la voie Wnt n'est pas clairement défini, mais certaines études suggèrent un rôle dans l'inhibition de la formation du complexe cytoplasmique par l'Axin, via une interaction directe entre les deux protéines (Kishida et al., 1999; Smalley et al., 1999). Par conséquent GSK3 ne phosphoryle pas  $\beta$ -catenin, et permet son accumulation (Salic et al., 2000).  $\beta$ -catenin est ensuite transloqué au noyau, où il sert de coactivateur pour les facteurs de transcription de la famille LEF / TCF (Lymphocyte Enhancer Factor / T-Cell Factor). En absence de stimulation, les facteurs LEF / TCF inhibent la transcription des gènes cibles de la voie Wnt (Bienz, 1998; Brannon et al., 1997; Riese et al., 1997). À ce sujet, il a été démontré que TCF interagit avec les membres de la famille Groucho (Cavallo et al., 1998; Roose et al., 1998), dont l'activité de répression résulte de leur association avec des HDAC (Chen et al., 1999b). Par contre, l'interaction de  $\beta$ -catenin avec LEF / TCF entraîne sa conversion en un activateur transcriptionnel des gènes cibles de la voie Wnt (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Enfin, plusieurs études ont démontré que la fonction de transactivation de  $\beta$ -catenin résulte de son interaction avec



**Figure 1-5:** Modèle simplifié illustrant les principaux effecteurs de la voie Wnt.  
 [ [http://www.em2.molmed.uni-erlangen.de/en/projects/Proj\\_wnt\\_en.htm](http://www.em2.molmed.uni-erlangen.de/en/projects/Proj_wnt_en.htm) ]

CBP / p300 et BRG1 (Barker et al., 2001; Hecht et al., 2000; Takemaru and Moon, 2000).

#### 1.3.5.2.1 La voie Wnt3a et le développement vertébral

Plusieurs études ont permis d'établir l'importance de la fonction exercée par le ligand Wnt3a dans le développement vertébral. Notamment, ses transcrits sont détectés au niveau de la ligne primitive et du bourgeon de la queue, qui génèrent les précurseurs du mésoderme (Takada et al., 1994). De plus, l'inactivation de Wnt3a entraîne une troncation axiale qui se manifeste de manière dose-dépendante, variant de l'absence de queue jusqu'à l'absence complète des structures caudales aux membres antérieurs (Greco et al., 1996; Takada et al., 1994). Ainsi, la diminution progressive des niveaux d'expression de *Wnt3a* prévient le développement de structures de plus en plus antérieures, indiquant qu'une élévation des niveaux d'expression est essentielle au développement normal des structures postérieures. Une autre étude rapporte la présence de transformations homéotiques vertébrales antérieures de type C2 en C1 chez tous les mutants *Wnt3a*<sup>-/-</sup> qui survivent à la naissance (Ikeya and Takada, 2001). Ces transformations sont aussi associées à une altération dans le profil d'expression des gènes *Hoxd3* et *Hoxb4*.

Les effecteurs nucléaires de la voie Wnt sont des facteurs de transcription de la famille LEF / TCF (LEF1, TCF1, TCF3 et TCF4). LEF1 et TCF1 sont tous deux abondamment exprimés dans les cellules de la ligne primitive et du bourgeon de la queue entre E7.5 et E8.5 (Galceran et al., 1999; Oosterwegel et al., 1993). De plus la distribution des transcrits forme un gradient de concentration, où les niveaux les plus élevés sont détectés dans la partie postérieure de l'embryon. À l'opposé, l'expression de TCF3 et TCF4 à ce stade est limitée à la partie antérieure du neurectoderme (Galceran et al., 1999; Korinek et al., 1998). Il existe donc un chevauchement entre le profil d'expression de LEF1 et TCF1 et celui du ligand Wnt3a, suggérant que Wnt3a influence le développement axial via ces effecteurs. Toutefois, l'inactivation de *Lef1* entraîne un arrêt dans le développement de la dentition, des follicules pileux et des glandes mammaires,

alors que celle de *Tcf1* affecte la différenciation des lymphocytes T (van Genderen et al., 1994; Verbeek et al., 1995). La possibilité d'une redondance fonctionnelle entre les deux protéines a ensuite été évaluée par la génération du double-mutant correspondant (Galceran et al., 1999). Les résultats de cette étude révèlent que les double-mutants manifestent certains phénotypes identiques à ceux observés chez les mutants *Wnt3a*, dont l'absence totale de mésoderme présomitique dans la région caudale aux membres antérieurs. Ensemble, ces évidences suggèrent que LEF1 et TCF1 soient impliqués dans la transduction du signal *Wnt3a* dans le mésoderme présomitique. Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par le fait que l'expression d'une forme constitutivement active de LEF1 puisse prévenir les effets engendrés par la mutation de *Wnt3a* (Galceran et al., 2001).

#### 1.3.5.2.2 *Wnt3a* régule l'expression de *Cdx1*

L'influence exercée par *Wnt3a* sur l'expression des gènes *Hox* et le développement axial, couplée à l'observation d'un chevauchement entre le profil d'expression de *Wnt3a* et *Cdx1* (Meyer and Gruss, 1993; Takada et al., 1994), a soulevé la possibilité que *Wnt3a* puisse réguler l'expression de *Cdx1*. Depuis, diverses études ont permis de confirmer cette hypothèse. Notamment, l'expression de *Cdx1* dans les cellules de la ligne primitive et du bourgeon de la queue, est diminuée au jour E8.5 chez les souris *Wnt3a*<sup>-/-</sup> et *vt/vt* (chez qui l'expression de *Wnt3a* est diminuée (Greco et al., 1996)) (Ikeya and Takada, 2001; Prinos et al., 2001). De plus, le traitement d'embryons en culture avec le ligand *Wnt3a* induit l'expression de *Cdx1* dans la partie postérieure de l'embryon. L'expression d'une fusion LEF1 /  $\beta$ -catenin, qui mime l'activation par la voie Wnt (Vleminckx et al., 1999), active la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle de séquences régulatrices de *Cdx1* en culture cellulaire. L'analyse de ces séquences a mené à l'identification de deux éléments de réponse reconnus par les facteurs LEF / TCF (LRE1 et LRE2) (Lickert et al., 2000; Prinos et al., 2001). Les résultats obtenus démontrent que ces séquences sont liées par LEF1, et essentielles à l'activation d'un gène rapporteur par le ligand *Wnt3a*. Enfin

l'importance des LRE dans la régulation de l'expression de *Cdx1* a été confirmée *in vivo* à l'aide de souris transgéniques, exprimant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de *Cdx1* (Lickert and Kemler, 2002). De manière intéressante, la mutation des LRE entraîne une absence complète d'activité du rapporteur entre E7.5 et E8.5.

#### 1.4 Les hypothèses

L'ensemble des données présentées dans les sections précédentes souligne le caractère essentiel de la fonction exercée par *Cdx1* au cours du développement axial. Par conséquent, il importe d'acquérir une meilleure compréhension des mécanismes qui contrôlent son expression. À cet effet, les deux projets suivants ont été développés.

Une étude a démontré que *Cdx2* est capable de s'autoréguler, dans les cellules intestinales et pancréatiques (Xu et al., 1999). Certaines évidences suggèrent que l'expression de *Cdx1* soit aussi sous le contrôle d'un mécanisme semblable (Prinos et al., 2001). D'abord, l'expression des transcrits *Cdx1* est fortement diminuée chez les mutants *Cdx1*<sup>-/-</sup> au jour E8.5. Cet effet est spécifique à ce stade puisqu'il n'existe aucune différence entre les niveaux d'expression détectés chez les mutants *Cdx1*<sup>-/-</sup> au jour E7.5 et ceux observés les souris sauvages. Ces résultats suggèrent que *Cdx1* soit requis pour le maintien de sa propre expression. Aussi, l'expression d'un vecteur encodant *Cdx1* active la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de *Cdx1* en culture cellulaire. Par contre, le promoteur de *Cdx1* ne contient aucune séquence consensus susceptible de pouvoir lier la protéine. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'autorégulation de *Cdx1* implique un mécanisme indirect. La vérification de cette hypothèse ainsi que la caractérisation du mécanisme d'autorégulation de *Cdx1*, sont détaillés dans l'article qui s'intitule « *Cdx1* autoregulation is governed by a novel *Cdx1*-LEF1 transcription complex », présenté dans le chapitre 2.

Par ailleurs, notre laboratoire a démontré que l'expression de *Cdx1* est induite par l'AR dans les cellules de la ligne primitive au jour E7.5 via un RARE

atypique (Houle et al., 2000; Houle et al., 2003). Un jour plus tard, l'expression de *Cdx1* est maintenue dans la partie caudale de l'embryon, par la voie Wnt3a (Prinos et al., 2001) ainsi que par un mécanisme d'autorégulation (Beland et al., 2004). L'AR est absent de la partie postérieure de l'embryon à ce stade, mais présent dans les domaines plus antérieurs, de la région du tronc (Rossant et al., 1991). Pourtant les transcrits *Cdx1* ne sont pas détectés dans cette région. Ensemble, ces observations nous ont amené à formuler l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme de répression prévenant l'expression de *Cdx1* dans la portion antérieure de l'embryon, riche en AR. La vérification de cette hypothèse ainsi que la caractérisation du mécanisme de répression de *Cdx1*, sont détaillés dans l'article qui s'intitule « COUP-TF members repress RA-induced *Cdx1* expression », présenté dans le chapitre 3.

## CHAPITRE 2

### ARTICLE

#### ***Cdx1* autoregulation is governed by a novel Cdx1-LEF1 transcription complex**

Mélanie Béland<sup>1,2,†</sup>, Nicolas Pilon<sup>1,†</sup>, Martin Houle<sup>1,2</sup>, Karen Oh<sup>1</sup>, Jean-René Sylvestre<sup>1</sup>, Panagiotis Prinos<sup>1,4</sup> et David Lohnes<sup>1,2,3,\*</sup>

- 1- Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins ouest, Montréal, Québec, Canada, H2W 1R7.
- 2- Département de Biologie Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
- 3- Département de Médecine Expérimentale, Université McGill, Montréal, Québec, Canada.
- 4- Adresse présente: Aurelium Biopharma Inc. 230 Bernard-Belleau, Suite 214 Laval, QC, H7V 4A9 Canada

†Ces auteurs ont contribué également à cet article.

**Molecular and Cellular Biology, Volume 24, Pages 5028-5038, 2004**

## 2.1 Avant-propos

L'article présenté dans la section suivante s'intitule « *Cdx1* autoregulation is governed by a novel Cdx1-LEF1 transcription complex ». Les auteurs ayant apportés leur contribution sont : Mélanie Béland, Nicolas Pilon, Martin Houle, Karen Oh, Jean-René Sylvestre, Panagiotis Prinos et David Lohnes. Cet article a été publié dans « Molecular and Cellular Biology » en 2004 (Vol24, p5028-5038). Il décrit une série d'expériences effectuées entre janvier 2002 et janvier 2004. La figure 2-1 a été réalisée à partir des travaux de N. Pilon alors que les figures 2-2 et 2-3 sont issues de notre collaboration. Les résultats présentés dans les figures 2-4A-D et F proviennent de mes expériences et ceux de la figure 2-4E, de celles de N. Pilon. La figure 2-5A fut réalisée à partir de mes résultats et la figure 2-5B, à partir de ceux de N. Pilon et des miens. Les figures 2-6 et 2-7 résultent d'une collaboration entre N. Pilon et M. Houle et la figure 2-8 a été réalisée à partir de mes expériences. Les autres auteurs ont fourni un support technique, incluant le clonage d'ADN et le croisement de souris. Les souris homozygotes pour la mutation qui affecte l'expression de *Cdx1* sont un don du Dr P. Gruss.



## 2.2 Manuscript

### Abstract

The *Cdx1* gene product is essential for normal anterior-posterior (A-P) vertebral patterning. Expression of *Cdx1* is regulated by several pathways implicated in A-P patterning events, including retinoid and Wnt signaling. We have previously shown that retinoic acid (RA) plays a key role in early stages of *Cdx1* expression at E7.5, while both Wnt3a signaling and an autoregulatory loop, dependent on Cdx1 itself, are involved in later stages of expression (E8.5 – E9.5). This autoregulation is reflected by the ability of Cdx1 to affect expression from proximal *Cdx1* promoter sequences in tissue culture. However, this region is devoid of demonstrable Cdx response element(s). We have now found that Cdx1 and LEF1, a nuclear effector of Wnt signaling, synergize to induce expression from the *Cdx1* promoter through previously documented LEF/TCF response elements. We also found a direct physical interaction between the homeodomain of Cdx1 and the B box of LEF1, suggesting a basis for this synergy. Consistent with these observations, analysis of *Cdx1* - *Wnt3a*<sup>vt</sup> compound mutants demonstrates that Wnt and Cdx1 converge on *Cdx1* expression and vertebral patterning *in vivo*. Further data suggest that Cdx - HMG-box interactions might be involved in a number of additional pathways.

## Introduction

Somites are derived from segmentation of paraxial mesoderm in the caudal embryo and subsequently differentiate into dermamyotome and sclerotome, the latter being the anlage of the vertebrae. Many vertebrae exhibit morphological differences along the anterior-posterior (A-P) axis, such as the ribs characteristic of thoracic vertebrae. These distinct morphological characteristics are indicative of patterning events which dictate vertebral identity along the A-P axis. A number of signaling molecules, such as retinoic acid (RA), are well documented to affect vertebral A-P patterning. All such effectors typically impact on expression of *Hox* genes, and a wealth of gain- and loss-of-function experiments clearly demonstrate a critical role for *Hox* gene products in vertebral patterning (9,11,13,19,27).

The 39 murine *Hox* genes are distributed in four clusters, *Hoxa* - *Hoxd*, which have likely evolved by duplication of an ancestral complex related to the *HOM-C* genes of *Drosophila* (17,18,20). In the mouse, *Hox* expression is initiated at embryonic day (E)7.5 in the primitive streak, with transcripts subsequently expanding anteriorly in the neural tube and mesoderm to eventually reach a predetermined rostral limit (14,46,51). The onset and rostral limit of expression is generally related to the location of a given *Hox* gene within its complex, with more 3' members initiated earlier and reaching more rostral limits of expression relative to 5' paralogs. This results in staggered domains of *Hox* expression along the A-P axis which has been suggested to comprise a "Hox code" (5,23,34).

While *Hox* genes are expressed initially in the primitive streak and subsequently in the somites and prevertebrae, grafting experiments in the chick embryo demonstrate that vertebral A-P patterning is imparted before overt segmentation of the paraxial mesoderm, likely during or shortly after gastrulation (35,45). Paraxial mesoderm from such transplants also retains *Hox* expression patterns characteristic of its original axial position, suggesting that the molecular program dictating A-P patterning is imparted during this early stage of vertebral ontogenesis.

Considerable effort has been directed to a better understanding of the mechanisms involved in establishing *Hox* gene expression. Recently, members of the vertebrate *Cdx* family, *Cdx1*, *Cdx2* and *Cdx4*, have emerged as important players in this process. *Cdx* genes encode homeodomain transcription factors related to *Drosophila caudal*. A number of studies suggest a key role for *Cdx* members in vertebral patterning by direct regulation of *Hox* expression. In particular, loss-of-function studies in the mouse have shown that *Cdx1* null mutants, *Cdx2* heterozygotes and *Cdx1*<sup>-/-</sup>/*Cdx2*<sup>+/-</sup> compound mutants all exhibit skeletal defects which are associated with a posterior shift in the anterior boundaries of expression of a number of *Hox* genes (8,56,61). Furthermore, consensus *Cdx* binding motifs have been identified in the promoter of many *Hox* genes (2,56) some of which direct spatial expression *in vivo* (7). Gain- and loss-of-function studies in chick and frog embryos also support a role for *Cdx* members in A-P patterning of both mesoderm and neurectoderm through regulation of *Hox* expression (3,31).

A number of signaling pathways, including RA and some members of the FGF and Wnt/wingless families, affect posterior embryonic patterning, at least in part through regulation of *Hox* expression. However, the means by which these signaling molecules impact on *Hox* expression is incompletely understood. A number of studies have demonstrated that *Cdx* family members respond to FGF, Wnt and RA, (3,28,30,31,48,50) suggesting that *Cdx* proteins serve to convey these signals to the *Hox* genes. Of particular relevance to the present study, we (28,50) and others (30) have shown that *Cdx1* is directly regulated by both RA and Wnt3a in the caudal embryo.

The Wnt signaling pathway is involved in many developmental processes (reviewed in (43,63)). Activation of the canonical Wnt signaling pathway results in stabilization of cytoplasmic  $\beta$ -catenin, which subsequently translocates to the nucleus and associates with LEF/TCF transcription factors (LEF1, TCF1, TCF3 or TCF4) to induce expression of target genes. *Wnt3a* is expressed in an overlapping manner with *Cdx1* in the primitive streak and tailbud of murine embryos (42,57). *Wnt3a* homozygous null embryos (57) and the *Wnt3a*

hypomorph vestigial tail (*vt*) (24) exhibit vertebral abnormalities which occur concomitant with reduced expression of *Cdx1* and certain *Hox* genes (30,50). This effect is likely mediated through two LEF/TCF response elements (LREs) present on the proximal *Cdx1* promoter which function in both tissue culture (39,50) and which are essential for normal expression of a *Cdx1* transgenic reporter *in vivo* (40). Among the Wnt nuclear effectors, LEF1 and TCF1 are most likely responsible for conveying the Wnt3a signal to *Cdx1* based on their overlapping patterns of expression (47,57), and the finding that *LEF1 - TCF1* double mutants phenocopy *Wnt3a* null mice (21,57).

In addition to regulation by Wnt and RA, Cdx1 is required to maintain its own expression *in vivo*. This autoregulation can be recapitulated in P19 embryocarcinoma cells in tissue culture, where Cdx1 can induce expression from a reporter vector comprised of proximal *Cdx1* genomic sequences (50). However, consensus Cdx1 binding motifs have not been identified in these sequences and the means by which this effect is mediated is unclear. We now present evidence that this autoregulation is mediated by direct physical interaction between Cdx1 and LEF1, with the latter binding to the *Cdx1* promoter. This interaction occurs between the homeodomain of Cdx1 and the B box of LEF1. Analysis of an allelic series of *Cdx1-Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* mutants further supports an interaction between Wnt signaling and *Cdx1* autoregulation *in vivo*. Finally, we present evidence that Cdx-HMG interactions may be involved in other regulatory pathways.

## Materials and Methods

**Plasmid Constructs.** The *Cdx1* genomic sequences and derivation of reporter vectors has been previously described (29,50). The Flag epitope-tagged *Cdx1* vector was generated by subcloning the relevant coding sequences into a modified pCEP4 plasmid (Invitrogen), while the Flag-tagged RAR $\gamma$  fusion construct was generated by PCR and subcloned into pSG5 (Stratagene). The reporter construct bearing four Cdx binding elements from the *Hoxb8* promoter was generated by subcloning EcMs79 sequences (7) into pTK109-Luc (44). Expression vectors for GST-Cdx1 fusion proteins were generated by PCR and subcloned in pGEX4T-1 (Amersham-Pharmacia). The LEF1 $\Delta$ Bbox vector was generated by PCR and subcloned into pSG5. The Cdx1- LEF1 fusion constructs were made by PCR and subcloned into pCMV5 $\beta$  (Liliana Attisano) or pCEP4Flag. Further details as to the derivation of these constructs are available upon request.

The pXPA17-5XUAS reporter vector harboring five GAL4 binding elements, and the expression vector pCMXGAL4DBD, used to generate GAL4-Cdx1 fusion constructs, were gifts from Mark Featherstone. Haemagglutinin (HA)-epitope tagged LEF1 expression vectors were provided by Liliana Attisano, while the LEF1 DNA binding domain/ $\beta$ -catenin activation domain (LEF1 $\Delta$ N- $\beta$ CTA) and the LEF1 N-terminal deletion mutant (LEF1 $\Delta$ N/pCS2) were provided by Andreas Hecht. The Flag-tagged  $\beta$ -Catenin expression vector was provided by David Rimm and the LEF/TCF reporter vector pGL3-OT and control pGL3-OF vector were provided by Bert Vogelstein.

**Cell Culture and Transfections.** P19 embryocarcinoma cells were propagated under standard conditions. For transfection analysis, cells were passed into 6-well plates and transfected the same day using the calcium phosphate precipitation method. Unless otherwise stated, transfections consisted of 1  $\mu$ g of reporter construct, 0.5  $\mu$ g expression vector(s) and empty vector (where required) to a final of 2  $\mu$ g DNA. The following day, the media was replenished and culture continued for another 24 hrs. Cells were then disrupted in 250  $\mu$ l of lysis buffer

(0.1M Tris pH 8.0, 1% Igepal, 1mM DTT) and assessed for luciferase activity using an AutoLumat LB953 luminometer (Berthold Technologies). Cos7 and F9 embryocarcinoma cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. Transfections were performed under identical conditions as for P19 cells except that 100-mm tissue culture plates were used with a total of 25 µg of expression vector(s) per transfection.

**Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assays.** ChIP assays were performed as previously described (38) using anti-FlagM2 antibody (Santa-Cruz Biotechnology, CA). PCR reactions were performed for 31 cycles (96° for 30 sec., 60° for 30 sec., 72° for 1 min.), using primers flanking the proximal *Cdx1* LREs, the *Cdx1* RARE or exon 3. Amplification products were resolved on a 2% agarose gel, transferred to Hybond N (Amersham-Pharmacia) membrane and hybridized with an internal oligonucleotide probe specific for the predicted amplification product (oligonucleotide sequences available on request).

**Immunoprecipitation Assays.** Cells were harvested in immunoprecipitation buffer (20 mM Tris pH 8, 25 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM DTT and protease inhibitors) and immunoprecipitated with mouse monoclonal anti-HA antibody (Covance, Berkeley, CA) using 20 µL of Protein A-G Plus-agarose (Santa Cruz). The beads were washed twice with immunoprecipitation buffer and proteins resolved by SDS-PAGE. Western blots were performed using the ECL method (Amersham-Pharmacia) using anti-FlagM2 antibody (Santa-Cruz Biotechnology, CA) at a 1/5000 dilution.

**GST fusion proteins.** 50 mL of bacterial culture, transformed with the appropriate GST-Cdx1 plasmid, was grown to an O.D. of 0.6-0.8 and treated with 0.5 mM IPTG for 2-3hrs. Cells were recovered by centrifugation, resuspended in 1.5 mL of PBS containing 1 mM DTT, 0.02% TritonX-100 and protease inhibitors and disrupted by sonication. TritonX-100 was added to a final concentration of 1% and the lysate incubated on ice for 15 minutes. Following centrifugation, the supernatant was incubated with glutathione-agarose beads

(Sigma) for 1h at 4°C. The beads were recovered by centrifugation, washed three times with PBS and used for *in vitro* binding assays.

**In Vitro Pull-Down Assays.** [<sup>35</sup>S]methionine-labelled LEF1 proteins were generated using TNT system (Promega). 5 µg of GST-fusion protein were incubated with 5 µl labelled LEF1 in 750 µl of TNEN buffer (50 mM Tris pH7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Igepal, 5 mM EDTA, 1 mM DTT and protease inhibitors). The beads were then washed with TNEN, proteins resolved by SDS-PAGE and interactions revealed by phosphorimaging.

**Generation and analysis of mice.** *Vestigial tail* (*Wnt3a*<sup>vt/vt</sup>) mice were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). *Cdx1* null mice were previously described (56). An allelic series of compound mutant offspring were generated from *Wnt3a*<sup>vt/+</sup> *Cdx1*<sup>+/-</sup> intercrosses. Mice were mated overnight and females examined the following morning for the presence of a vaginal plug; noon of the day of plug was considered as embryonic day (E)0.5. CD1 mice (Charles River) were used as wild type controls; no overt differences in gene expression have been observed between CD1 offspring relative to wild type offspring from the *Wnt3a*<sup>vt</sup> or *Cdx1* mutant colonies (50). *In situ* hybridization and skeletal preparations were performed as previously described (1,50).

## Results

### **Cdx1 associates with its own promoter *in vivo*.**

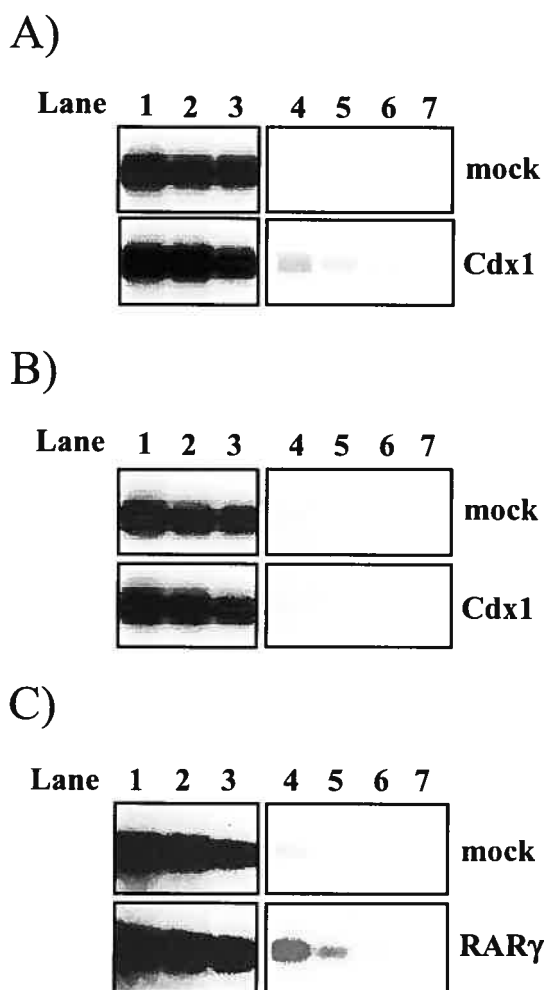
*Cdx1* expression is lost in *Cdx1* mutants at E8.5 (Prinos *et al.* 2001), suggestive of an autoregulatory loop. Cdx1 can induce expression from *Cdx1* promoter sequences in transfection assays. However, Cdx response elements are not evident in these sequences (16,50), and EMSA analysis has failed to reveal association of Cdx1 to any region of this promoter (our unpublished observation). Despite the absence of such regulatory elements, ChIP experiments demonstrated that the Cdx1 protein is present on the proximal *Cdx1* promoter (Fig.2-1A), but not on more distal sequences (Fig. 2-1B). This association was comparable to RAR binding to this region, which likely occurs through a previously documented RARE (28) (Fig.2-1C).

### **Cdx1 and LEF1 act synergistically.**

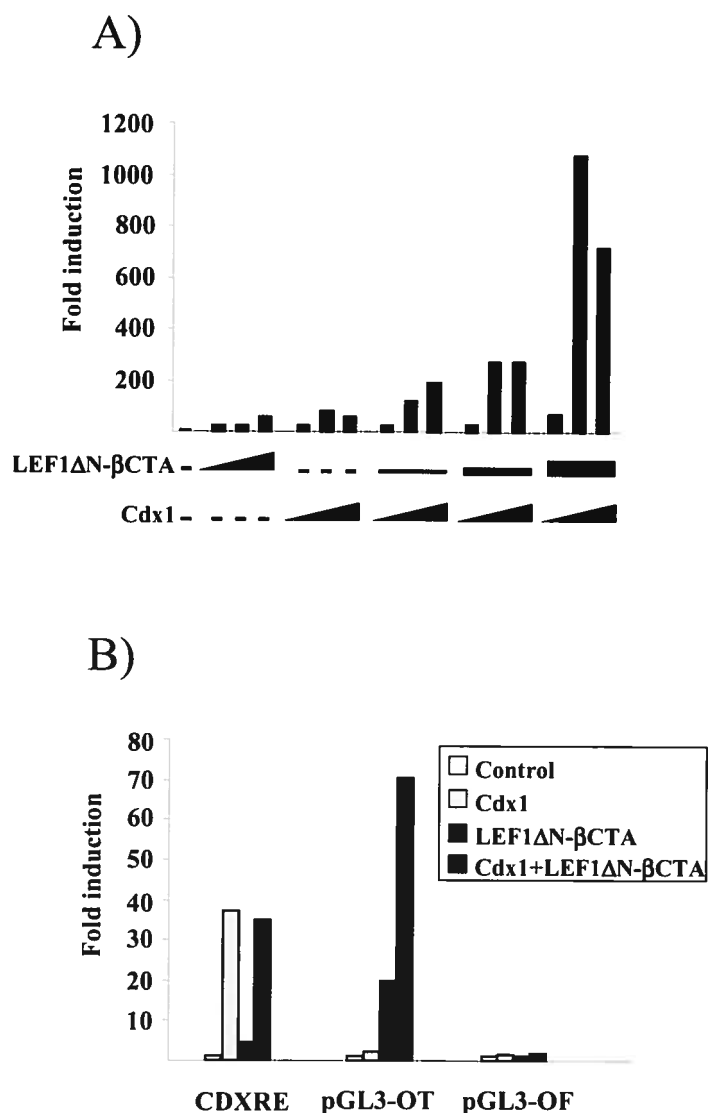
The above data suggest that Cdx1 is able to associate with its own promoter. While cryptic Cdx1 binding elements cannot be ruled out, one alternative possibility is that Cdx1 may interact with other relevant transcription factors, including RARs or LEF/TCF members. Transfection analysis were therefore used to examine the effect of LEF1, RA and Cdx1, individually or in combination, on expression of a *Cdx1* reporter in P19 cells.

In agreement with previous findings, RA, LEF1 and Cdx1 all induced the *Cdx1* reporter (Fig.2-2A and data not shown) (50). Only additive interactions were seen between RA and Cdx1 in transfection analysis (data not shown). However, a strong interaction was observed between a LEF1- $\beta$ -catenin fusion protein (LEF1 $\Delta$ N- $\beta$ CTA; 62) and Cdx1 which greatly exceeded the additive values achieved with either transcription factor alone. This outcome was not likely an artifact of the non-physiological fusion protein, since a similar synergistic interaction was also seen between Cdx1, LEF1 and  $\beta$ -Catenin (data not shown). Moreover, we observed that all three proteins coimmunoprecipitate





**Figure 2-1.** Cdx1 is present on its own promoter *in vivo*. (A,B) Anti-Flag ChIP analysis of the endogenous *Cdx1* promoter (A) or downstream sequences used as a negative control (B) on mock transfected (upper panel) or Flag-Cdx1 transfected (lower panel) F9 cells. (C) Identical analysis of the endogenous *Cdx1* promoter on mock transfected (upper panel) or Flag-RARγ (lower panel) transfected F9 cells. After anti-Flag immunoprecipitation of the sonicated chromatin extracts, DNA was purified and amplified by PCR using oligonucleotides spanning the region of the *Cdx1* promoter encompassing the LREs in (A), the RARE in (C) or exon 3 in (B). Products were resolved by agarose gel electrophoresis and assessed by Southern blot analysis using an internal oligonucleotide probe specific to the predicted amplification products. Lanes 1 to 3 (before immunoprecipitation) and 4 to 6 (after immunoprecipitation) represent PCR amplifications of serial dilutions of DNA prior to amplification. Lane 7 is a negative control in which DNA was not included.



**Figure 2-2.** Synergy between Cdx1 and LEF1. (A) P19 cells were transfected with the 2Kb *Cdx1* promoter alone or with the various amounts of the expression vectors (0.05 to 0.5 mg) as indicated. Cells were harvested 48h post-transfection and extracts assessed for luciferase activity. Data are expressed as fold induction relative to the reporter vector alone. (B) P19 cells were transfected with either a reporter construct harboring Cdx1 binding sites from the *Hoxb8* promoter (CDXRE), or with wild-type (pGL3-OT) or mutant (pGL3-OT) LEF/TCF response elements. Transfections were done with the reporter vector alone or with the indicated expression constructs. Luciferase activity was determined as above and expressed as fold induction relative to reporter vector alone.

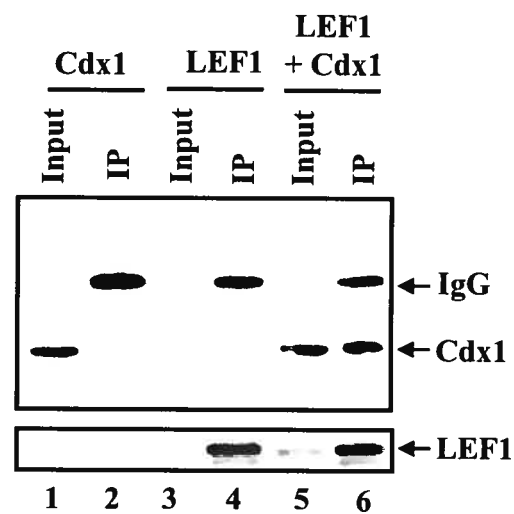
from cells (data not shown), suggesting that a Cdx1-LEF1- $\beta$ -Catenin complex forms on the Cdx1 promoter, and exerts a strong effect on expression.

To further understand the basis for the synergistic interaction between LEF1 and Cdx1, the ability of LEF1 $\Delta$ N- $\beta$ CTA and Cdx1 to regulate synthetic reporter vectors harboring either Cdx or LEF/TCF response elements was examined. The *Hoxb8* promoter contains a regulatory element consisting of four functional Cdx binding sites (7). Transfection analysis revealed that Cdx1 elicited a strong transcriptional response through these elements (Fig. 2-2B). LEF1 $\Delta$ N- $\beta$ CTA alone did not activate this reporter, and cotransfection with both Cdx1 and LEF1 $\Delta$ N- $\beta$ CTA gave an induction comparable to that seen with Cdx1. The pGL3-OT and pGL3-OF reporters contain three wild type or mutant LEF/TCF response elements, respectively (25). As expected, LEF1 $\Delta$ N- $\beta$ CTA mediated a significant induction of pGL3-OT which was lost in pGL3-OF. While Cdx1 did not induce the pGL3-OT reporter, it markedly potentiated the effect of LEF1 $\Delta$ N- $\beta$ CTA (Fig. 2-2B). This interaction was abolished upon mutation of the LEF/TCF binding sites. Taken together, these data suggest that LEF1 and Cdx1 can synergize in a manner that is dependent on association of LEF1 with cognate response elements, but in the absence of direct binding of Cdx1 to the DNA.

### **Cdx1 and LEF1 interact *in vitro* and *in vivo*.**

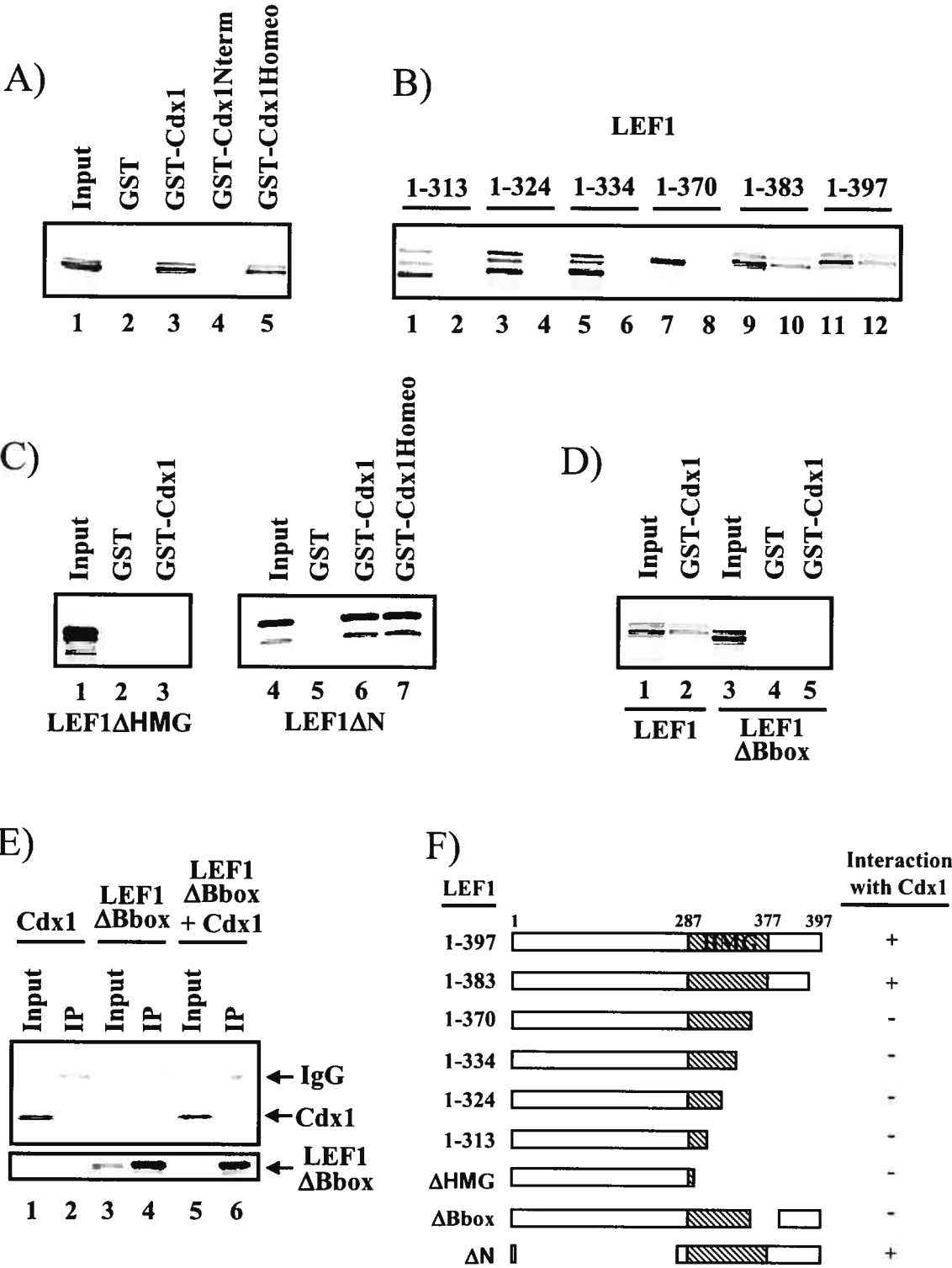
The synergy observed between LEF1 and Cdx1 in transcription assays, together with the observations from ChIP studies, suggested that these two proteins might interact physically to regulate *Cdx1* expression. We initially tested this by coimmunoprecipitation experiments from Cos7 cells transfected with epitope-tagged Cdx1 and LEF1, and found that Cdx1 co-immunoprecipitated with LEF1 when the two were co-expressed (Fig. 2-3).

To determine if LEF1 and Cdx1 association was direct, we used GST-Cdx1 fusion proteins and *in vitro* translated LEF1 to assess interaction in a cell-free system. All GST-Cdx1 fusions were stably expressed, as evaluated by Coomassie blue staining (data not shown). As shown in Figure 2-4A, LEF1 interacted with GST-Cdx1, but not with GST alone. Similar assays indicated that



**Figure 2-3.** Cdx1 interacts with LEF1 *in vivo*. Whole cell lysates from Cos7 cells transfected with Cdx1-Flag and/or Lef1-HA expression vectors were immunoprecipitated with anti-HA antibody and analyzed by western blot using an anti-Flag antibody (top panel). Expression of LEF1 was assessed by reprobing the blot with an anti-HA antibody (bottom panel). Inputs represent 5% of total lysate used for immunoprecipitation.

**Figure 2-4.** Cdx1 interacts directly with LEF1. GST-Cdx1 and 35S-labelled LEF1 constructs were generated and assessed for interaction as described in materials and methods (A) Both full length Cdx1 (GST-Cdx1) and the Cdx1 homeodomain (GST-Cdx1Homeo) interact with LEF1 (lanes 3 and 5), whereas Cdx1 N-terminal sequences do not (lane 4). (B) Deletion of sequences N-terminal to position 383 of LEF1 abolished interaction with Cdx1 (compare lane 10 to lane 8; odd numbered lanes are 20% input of the various 35S-labelled LEF1 constructs, even numbered lanes are from GST-Cdx1 pulldown). (C) Deletion of the LEF1 HMG box (lane 3) abolishes interaction with Cdx1, whereas loss of N-terminal LEF1 residues has no effect on interaction with either full length (lane 6) or homeodomain sequences (lane 7) of Cdx1. (D, E) Deletion of the LEF1 B box abolishes interaction with Cdx1 *in vitro* (Panel D, lane 5 compare to lane 2) and *in vivo* (panel E, lane 6). (F) Schematic representation of the LEF1-Cdx1 interactions. Coimmunoprecipitations (panel E) were performed as in Fig.2-3 except the  $\Delta$ Bbox mutant was used instead of full-length LEF1.



the Cdx1 homeodomain alone was sufficient for association with LEF1, whereas N-terminal sequences failed to interact (Fig. 2-4A). In order to exclude the possibility of both proteins binding non-specifically to contaminating DNA, we repeated the assay in the presence of ethidium bromide, which prevents Cdx1-DNA interactions (data not shown), and found that it did not affect the Cdx1/LEF1 association (data not shown).

To further characterize the LEF1-Cdx1 association, we used deletion analysis to determine the LEF1 sequences mediating the interaction with the Cdx1 homeodomain. Progressive deletion of the C-terminal region of LEF1 completely abolished interaction with GST-Cdx1 when the integrity of the HMG-box was affected (Fig. 2-4B; summarized in Fig. 2-4F). Indeed, internal deletion of C-terminal HMG-box sequences abrogated interaction with Cdx1, whereas loss of the entire N-terminal region of LEF1 had no effect on association with either the full length protein or the Cdx1 homeodomain (Fig. 2-4C).

Previous work suggested that a 9 amino-acid sequence, the B box, located within the C-terminal region of the HMG domain, is involved in both nuclear localization of LEF1 and in contributing to DNA binding (49). To assess the potential involvement of the B box in Cdx1 interaction, we generated a LEF1 mutant lacking the B box and assessed its ability to associate with Cdx1. As shown in Figure 2-4D, GST-Cdx1 interacted with full-length LEF1 but not with the B box mutant. Similar data were also seen *in vivo*, where a LEF1 $\Delta$ Bbox mutant failed to interact with Cdx1 (Fig. 2-4E). Together, these data demonstrate that the Cdx1 homeodomain binds to LEF1 B box sequences.

### **The transactivation domain of Cdx1 confers transcriptional activity to LEF1 HMG-box sequences.**

The mechanism by which Cdx1 activates transcription is poorly understood. We used a mammalian one hybrid approach to identify transactivation domains, using Cdx1-GAL4 DBD chimeras and assaying their ability to activate transcription from GAL4 binding elements. Western blot analysis indicated that all fusion proteins were stably expressed (data not shown).

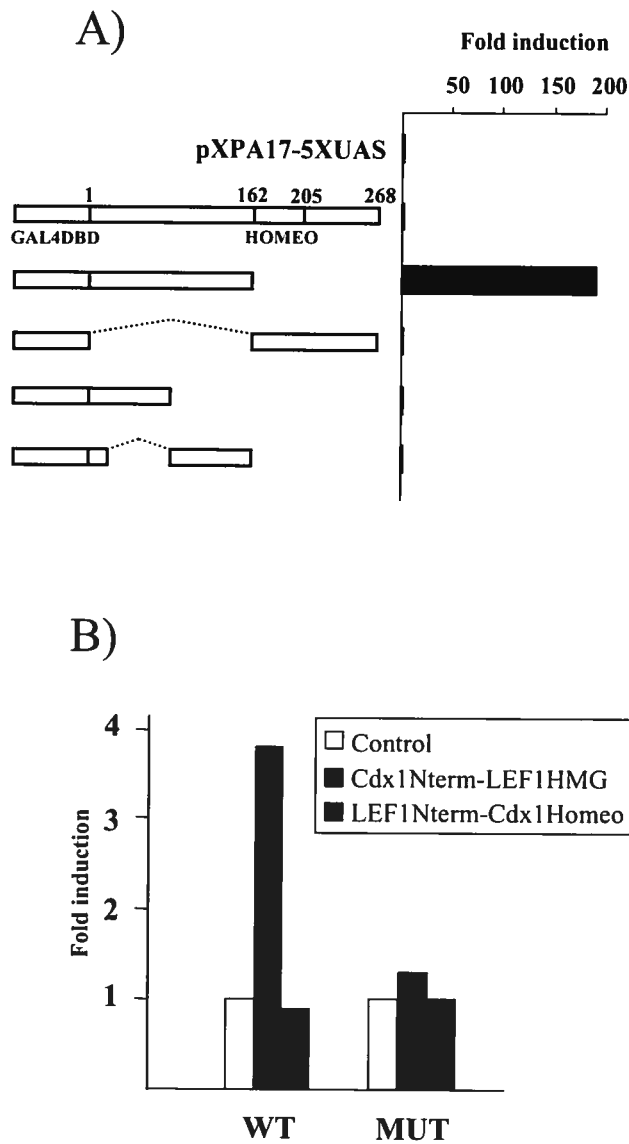
Unexpectedly the chimera containing full-length Cdx1 did not exhibit significant transcriptional activity (Fig. 2-5A), perhaps due to steric hindrances which may prohibit proper DNA binding and/or co-activator recruitment. In marked contrast, deletion of the C-terminal sequences resulted in significant reporter activation. However, additional dissection of this region resulted in loss of transactivation potential (Fig. 2-5A and data not shown). Interestingly, the transactivation domains of Cdx2 (58,59) and Xcad3 (the *Xenopus* homologue of Cdx4) (31), map to a similar region, despite the relatively weak conservation between these sequences (22).

We subsequently determined whether recruitment of the Cdx1 transactivation domain to the *Cdx1* LEF/TCF response elements could regulate expression. To assess this, we generated chimeras consisting either of the N-terminal Cdx1 sequences and the HMG box of LEF1, or the LEF1 N-terminal region fused to the Cdx1 homeodomain and compared their ability to induce transcription of a reporter containing 180bp of the proximal *Cdx1* promoter, a region which harbors two LEF/TCF response elements (39,50). As shown in Fig. 2-5B, only the Cdx1 N-terminal - LEF1 HMG fusion protein transactivated this reporter, and this outcome required the LEF/TCF response elements. This observation is consistent with a model whereby LEF1 serves to recruit Cdx1 to the *Cdx1* promoter, where it contributes to transactivation. It is notable that this chimera elicited a considerably weaker induction than that seen using Cdx1-LEF1 and  $\beta$ -catenin. This may be due to a key role for  $\beta$ -Catenin in regulating transcription from the *Cdx1* promoter, consistent with our finding that all three proteins co-immunoprecipitate (data not shown).

### **Genetic evidence for Cdx1-LEF/TCF interactions.**

To determine the *in vivo* relevance of Cdx1-LEF1 interactions, we assessed the skeletal morphology of an allelic series of *Cdx1* - *Wnt3a*<sup>vt</sup> compound mutants. The *Wnt3a*<sup>vt</sup> mouse, a *Wnt3a* hypomorph, was chosen for this analysis since *Wnt3a* null mutants have severe caudal defects which preclude assessment





**Figure 2-5.** The transcriptional activation domain of Cdx1 activates the *Cdx1* promoter. (A) The N-terminal domain of Cdx1 contains a transactivation function. P19 cells were transfected with a reporter vector containing GAL4 binding elements (pXPA17-5XUAS), alone or with the indicated GAL4DBD-Cdx1 fusion. Luciferase activity was measured 48h post-transfection and expressed as fold induction relative to the reporter vector alone. (B) The N-terminal domain of Cdx1 can activate transcription from the *Cdx1* promoter when fused to the LEF1 HMG box. P19 cells were transfected with the 180bp proximal *Cdx1* reporter construct (WT) or an identical construct lacking the LREs (MUT). Transfections were performed either with the reporter vector alone or with the indicated fusion construct. Luciferase activity and results were determined as above.

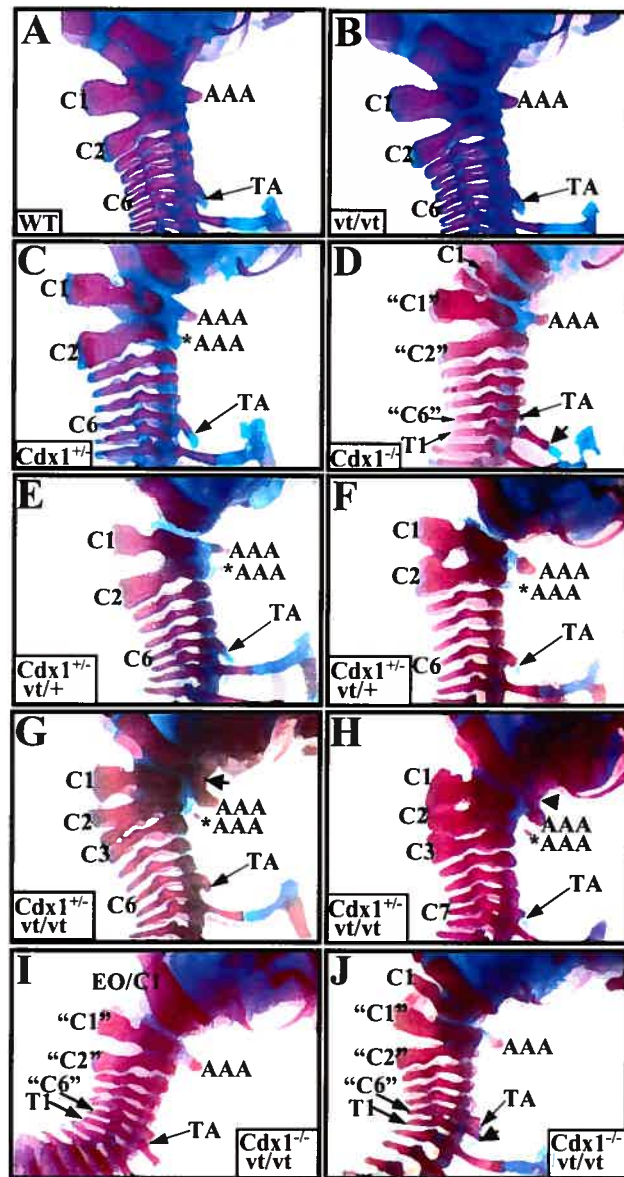
of the direct impact of Wnt signaling on *Cdx1* expression; a similar caveat applies to *LEF1/TCF1* double null mutants (21,57).

The murine vertebral column is composed of 7 cervical (C1-C7), 13 thoracic (T1-T13), 6 lumbar (L1-L6), 3 or 4 sacral (S1-S4) and 31 caudal vertebrae. The first cervical vertebrae (C1 or atlas) exhibits thick neural arches (NA) and possesses a ventrally located tubercle, the anterior arch of the atlas (AAA; Fig. 2-6A). The neural arches of C2 are intermediate to those of C1 and more posterior cervical vertebrae. C3, C4 and C5 are virtually identical to one another, while C6 is distinguished by the ventrally protruding anterior tuberculi (TA). The thoracic vertebrae are characterized by the presence of ribs, the first seven of which (T1-T7) are attached to the sternum.

All combinations of *Cdx1-Wnt3a<sup>vt</sup>* compound mutants were viable and fertile. *Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* offspring exhibited a foreshortened tail, as previously described (30,57), and this phenotype was not exacerbated by subsequent loss of *Cdx1* (data not shown). We did not detect any vertebral defects in the *Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* background, although a low incidence of a subtle C2-C1 malformation has been reported by others (30) (Table 2-1 and Fig.2-6B). As described previously (Allan *et al.* 2001) *Cdx1<sup>+/-</sup>* offspring exhibited certain vertebral defects; C2 often presented characteristics indicative of a C1 morphology, including an AAA-like structure and/or thicker neural arches (Table 2-1 and Fig. 2-6C). The neural arches of C1, C2 and C3 were frequently malformed (Table 2-1 and Fig. 2-6C), and basioccipital - AAA fusions were observed at a lower frequency.

*Cdx1<sup>-/-</sup>* offspring also exhibited vertebral defects consistent with prior work (Table 2-1, Fig. 2-6D;(1,56). Close apposition or fusion of C1 to the basioccipital bone, accompanied by a reduction of C1 neural arches and loss of the AAA, was observed in all *Cdx1* mutants. This occurred concomitantly with C2 to C1, C3 to C2 and C6 to C5 transformations, determined by morphological criteria as previously described (1,56). Most *Cdx1<sup>-/-</sup>* skeletons also exhibited partial ribs on the eighth vertebra (i.e. presumptive T1). A significant percentage of the skeletons also exhibited a T1 to C7 phenotype.

**Figure 2-6.** Skeletal analysis of *Cdx1-Wnt3avt* compound mutants. Cervical region of whole-mount skeletal preparations from (A) wild-type; (B) *Wnt3a<sup>vt/vt</sup>*; (C) *Cdx1<sup>+/-</sup>*; (D) *Cdx1<sup>-/-</sup>*; (E,F) *Cdx1<sup>+/-</sup>Wnt3a<sup>vt/+</sup>*; (G,H) *Cdx1<sup>+/-</sup>Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* and; (I,J) *Cdx1<sup>-/-</sup>Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* offspring. Note the normal cervical region for both wild-type (A) and *Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* (B) mice. (C, E and F) *Cdx1<sup>+/-</sup>* and *Cdx1<sup>+/-</sup>Wnt3a<sup>vt/+</sup>* mice exhibit similar phenotypes, notably an ectopic anterior arch of the atlas (\*AAA), a broader C2 neural arch and, for (F), a C1-C2 fusion. (D, I and J). *Cdx1* null and *Cdx1<sup>-/-</sup>Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* mice exhibit identical vertebral defects, notably malformation and malposition of C1, anterior transformation of C2, C3 and C7, denoted "C1", "C2" and "C6", respectively. The arrowhead in (J) indicates a partial rib associated with presumptive T1 which does not reach the sternum. (G, H) *Cdx1<sup>+/-</sup>Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* offspring exhibit an exacerbated phenotype compared to either single mutant (Compare G, H) to (B and C). In particular, note the fusion of the AAA with the basioccipital bone (arrowhead) and the presence of an ectopic anterior arch of the atlas. Note also the malformations and fusions of C1 to C3 neural arches and, for (H), the presence of TA on C7 instead of C6. Abbreviations: AAA, anterior arch of the atlas; \*AAA, ectopic anterior arch of the atlas; TA, tuberculum anterior; EO, exoccipital; C, cervical vertebrae; T, thoracic vertebrae; quotation marks indicate presumptive anterior transformations.



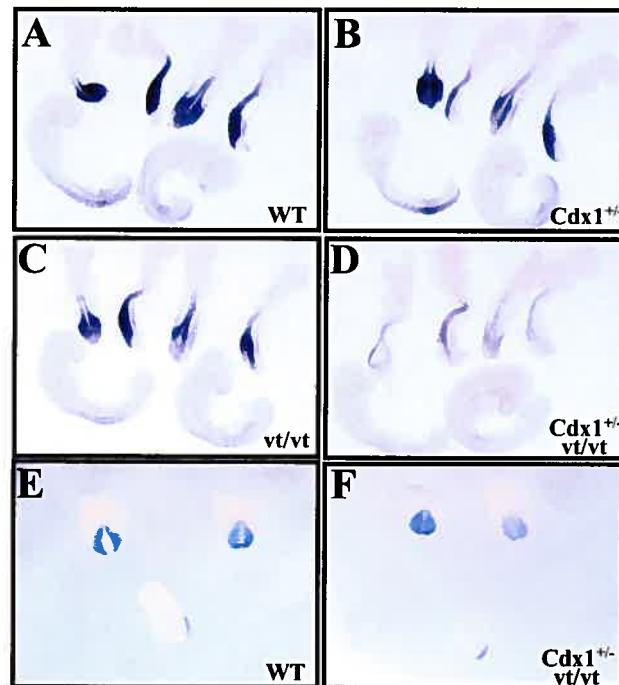
**Table 2-1**  
Vertebral Phenotypes of Compound *Wnt3a*<sup>wt</sup>-*Cdx1* Mutants

Phenotype	Genotype						
	<i>WT</i> <i>n</i> = 14 (%)	<i>Wnt3a</i> <sup>wt/wt</sup> or <i>wt/+</i> <i>n</i> = 20 (%)	<i>Cdx1</i> <sup>+/+</sup> <i>n</i> = 18 (%)	<i>Cdx1</i> <sup>+/-</sup> <i>n</i> = 29 (%)	<i>Wnt3a</i> <sup>wt/+</sup> <i>Cdx1</i> <sup>+/+</sup> <i>n</i> = 20 (%)	<i>Wnt3a</i> <sup>wt/wt</sup> <i>Cdx1</i> <sup>+/-</sup> <i>n</i> = 21 (%)	<i>Wnt3a</i> <sup>wt/wt</sup> <i>Cdx1</i> <sup>-/-</sup> <i>n</i> = 20 (%)
Basioccipital							
Fusion to AAA			2 (11)	29 (100)	2 (10)	9 (43)	20 (100)
Vertebrae 1							
Malformed NA	—	—	3 (17)	—	6 (30)	5 (24)	—
Fusion to occipitals	—	—	—	29 (100)	—	—	18 (90)
Vertebrae 2							
C1 identity (AAA and/or thick NA)	—	—	10 (56)	29 (100)	12 (60)	20 (96)	20 (100)
Malformed NA	—	—	2 (11)	—	8 (40)	18 (86)	—
Vertebrae 3							
C2 identity	—	—	—	29 (100)	—	4 (19)	20 (100)
Malformed NA	—	—	1 (6)	4 (14)	—	5 (24)	1 (5)
NA fusions							
V1-V2	—	—	1 (6)	—	6 (30)	3 (14)	—
V2-V3	—	—	1 (6)	—	—	4 (19)	—
TA on Vertebrae 7 instead of Vertebrae 6	—	—	—	28 (97)	1 (5)	4 (19)	20 (100)
Vertebrae 8							
C7 identity	—	—	—	11 (38)	—	—	2 (10)
Incomplete ribs	—	—	—	18 (62)	—	—	11 (55)

The *Cdx1*<sup>+/-</sup>*Wnt3a*<sup>vt/+</sup> mice presented phenotypes approximating that of *Cdx1* heterozygote mutants, albeit with a higher incidence of malformed neural arches and C2-C1 fusion (Table 2-1 and Fig. 2-6E and F). The *Cdx1*<sup>-/-</sup>*Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> double mutants also closely phenocopied *Cdx1* single null offspring (Table 2-1 and Fig. 2-6I and J). This latter result is in accordance with previous observations that put Wnt3a signaling upstream of *Cdx1* (50).

In marked contrast to the double mutant phenotype, *Cdx1*<sup>+/-</sup>*Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> offspring exhibited a profound synergistic interaction relative to the defects observed in either individual background (Table 2-1 and Fig. 2-6G and H). Fusion between the AAA and the basioccipital bone, observed at a low incidence in *Cdx1* heterozygotes, and never in *Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> offspring, was found in approximately half of the *Cdx1*<sup>+/-</sup>*Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> compound mutants. The incidence of malformation of the neural arches of C1, C2 and C3, and C2 to a C1 transformation was also markedly increased. Transformation of C3 to a C2 identity occurred in about 20% of *Cdx1*<sup>+/-</sup>*Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> offspring, but was never seen in *Cdx1*<sup>+/-</sup> or *Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> backgrounds.

As *Cdx1*<sup>+/-</sup>*Wnt3a*<sup>vt/+</sup> mutants phenocopy *Cdx1*<sup>+/-</sup> mice, and *Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> offspring exhibit a wild type axial skeleton, the increased penetrance of the defects seen in *Cdx1*<sup>+/-</sup>*Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> offspring cannot be explained by a simple additive effect of *Cdx1* and *Wnt3a* on vertebral patterning but rather by a synergistic interaction. Such a mechanism is in agreement with the physical interaction between *Cdx1* and LEF1 on the *Cdx1* promoter. To further investigate this possibility, *Cdx1* expression was assessed in the relevant mutant backgrounds by whole-mount *in situ* hybridization on E8.5 and E9.5 embryos. Despite the high incidence of homeotic transformations in *Cdx1*<sup>+/-</sup> mice, *Cdx1* expression was not appreciably altered (Fig. 2-7A and B). This is consistent with the prior finding that both wild type and mutant *Cdx1* transcripts are equally stable, and therefore that the homeosis observed in *Cdx1*<sup>+/-</sup> offspring is due to reduction in *Cdx1* protein per se (50). *Cdx1* expression was marginally downregulated in the tailbud of *Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> embryos, as previously described (Fig. 2-7C and (50)), although this reduction is apparently not sufficient to affect vertebral patterning. Finally, a



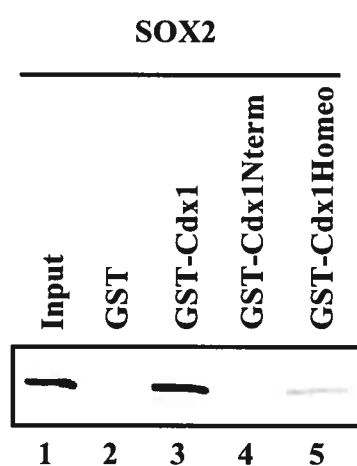
**Figure 2-7.** Stage-specific attenuation of *Cdx1* expression in *Cdx1*<sup>+/-</sup> *Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> compound mutants. *Cdx1* expression was assessed by whole-mount *in situ* hybridization in E8.5 (A to D) or in E7.5 (E, F) embryos. (A,E) Wild-type control. (B) *Cdx1*<sup>+/-</sup> mice. (C) *Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> mice. (D,F) *Cdx1*<sup>+/-</sup> *Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> mice. Note the near-complete loss of *Cdx1* expression at E8.5 in *Cdx1*<sup>+/-</sup> *Wnt3a*<sup>vt/vt</sup> embryos relative to the cognate mutant backgrounds while expression is unaffected at E7.5.

strong reduction of *Cdx1* expression was observed in *Cdx1<sup>+/-</sup>Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* embryos (Fig. 2-7D) in close agreement with the synergistic effect of these mutant alleles on vertebral morphogenesis. We also found that this effect was stage-specific since no differences were detected at E7.5 (Fig. 2-7E, F), which is in accordance with previous findings demonstrating that *Cdx1* autoregulation commences around E8.5 (50). These observations are consistent with a mechanism for *Cdx1* autoregulation involving an interaction between Cdx1 and LEF/TCF on the *Cdx1* promoter.

### **Cdx1 interacts with Sox2.**

The HMG box is a conserved sequence shared by many transcription factors. We therefore asked whether Cdx1/HMG-box interaction could reflect a more general paradigm. Using *in vitro* interaction assays, we found that Cdx1, and the homeodomain sequences alone, could interact with Sox2, a member of the Sry related HMG box family of transcription factors (12)(Fig. 2-8). Conversely, Sox2 failed to interact with Cdx1 N-terminal sequences. This association appeared to be specific, since no interaction was observed under identical conditions using Sox9 (data not shown), suggesting that Cdx1 may interact with a subset of HMG-containing proteins.





**Figure 2-8.** The Cdx1 homeodomain interacts with Sox2 *in vitro*. [35S]-labelled Sox2 was incubated with GST alone or GST-Cdx1 (full-length, N-terminal or homeodomain only). Sox2 specifically interacts with both full length Cdx1 (lane 3) and the Cdx1 homeodomain (lane 5).

## Discussion

Our prior work suggested that *Cdx1* expression is dependent on some form of autoregulation (50). Since we could not demonstrate direct Cdx binding on *Cdx1*-responsive promoter sequences, we postulated that the autoregulation either involves an intermediate which is itself a Cdx1 target or is dependent on a cofactor(s) which acts in concert with Cdx1 to regulate *Cdx1* expression. In the present study, we present evidence supporting the latter mechanism of action. We found that Cdx1 can be detected on its own promoter *in vivo* and can synergize with LEF1 in inducing transcription from *Cdx1* sequences containing LEF/TCF response elements. We also demonstrated that Cdx1 and LEF1 physically interact. The importance of this interaction *in vivo* is suggested by the synergistic effect of *Cdx1* and *Wnt3a*<sup>wt</sup> mutant alleles on *Cdx1* expression and vertebral patterning. As Cdx1 can also interact with Sox2, these data further suggest that Cdx-HMG interactions may be involved in the transcription of additional target genes.

### **Cdx1 interacts with LEF1 to mediate *Cdx1* expression in presomitic mesoderm**

We, and others (16,50) have been unable to find evidence for direct binding of Cdx proteins to *Cdx1* promoter sequences. However, in the present study, ChIP studies indicated that Cdx1 was indeed present on its own promoter in a manner similar to RAR, a direct regulator of *Cdx1* expression (28,29). Moreover, we found synergistic interactions between Cdx1 and LEF1 in transfection assays, suggesting that Cdx1 autoregulation might be mediated via a LEF1-dependent mechanism. Consistent with this, we found that Cdx1 and LEF1 physically interact and mapped the Cdx1 interacting domain to the B box of LEF1.

The B box sequence of all LEF/TCF proteins is highly conserved, suggesting that other members of this family can substitute for LEF1 in Cdx1 association and autoregulation. In this regard, TCF4 can mediate Wnt induction of *Cdx1* expression in several cell types (16,26,39). However, as regards vertebral patterning, *LEF1* and *TCF1* are co-expressed with *Cdx1* in the posterior embryo,

with transcripts for all three genes found with a caudal-high distribution in the posterior embryo (42,47). In agreement with this, *Cdx1* is a Wnt3a target, and it has been shown that LEF1 and TCF1 are critical transducers of the Wnt3a signal in the caudal embryo (30,30). Analysis of Wnt3a<sup>vi</sup> – Cdx1 compound mutants, discussed below, also supports a role for LEF1 in Cdx1-dependent vertebral patterning.

Although the above observations suggest that LEF1 and TCF1 are the principal mediators of *Cdx1* expression in the caudal embryo, *Cdx1* is co-expressed with these and other *LEF/TCF* family members in a number of other tissues, including the limb bud, intestinal epithelium and, to a lesser extent, the CNS (10,37,42,54). While a role for Cdx1 in these tissues has not been described, perhaps due to functional redundancy with Cdx2 (61), this expression pattern may reflect an autoregulatory loop similar to that proposed for *Cdx1* in the caudal embryo.

#### **A DNA-binding independent role for Cdx1?**

The Cdx1-LEF1 interaction is not the first example of homeodomain/HMG-box interactions. Indeed, the non-histone chromatin-associated protein HMG1 is able to interact with numerous Hox proteins (65). However, HMG1 null mutants do not exhibit a phenotype related to Hox loss-of-function (6), suggesting that this may be a spurious or vestigial interaction. A number of Pou homeodomain and Sox-HMG proteins have also been shown to associate (41,55), although these interactions are typically accompanied by direct DNA binding of each factor to cognate response elements. An interaction between the paired-like homeodomain protein Alx4 and LEF1 has also been reported (4). In this case, the N-terminal region of Alx4, and not its homeodomain, has been shown to interact with the LEF1 HMG-box. Moreover, as with Pou-Sox interactions, both Alx4 and LEF1 bind to cognate response elements, with Alx4 DNA-binding being enhanced by interaction with LEF1; similar observations have been made as regards HMG1-Hox-DNA interactions (4,4,65,65).

The above data are indicative of HMG-homeodomain interactions in which both partners directly bind to DNA, and in at least some cases, this binding is modulated by protein-protein interaction. We have, however, been unable to detect direct Cdx1 binding with any *Cdx1* promoter sequences. It is conceivable that a cryptic Cdx binding site exists that functions, for example, in the context of chromatin. Indeed, such a chromatin-dependent event could explain our inability to demonstrate the presence of LEF1-Cdx1 complexes on DNA in electrophoretic mobility shift assays (our unpublished observation). In this regard, chromatin has been shown to have profound effects on LEF1 interaction with  $\beta$ -catenin (60).

While we cannot unequivocally discount direct Cdx1-DNA interactions as a mechanism contributing to *Cdx1* autoregulation, our data support a model whereby Cdx1 exerts effects on transcription through an interaction with LEF1. In addition to genetic analysis of *Wnt3a<sup>vt</sup>-Cdx1* compound mutants and physical interaction data, this possibility is also supported by the finding that Cdx1 potentiated LEF1-induced expression from the pGL3-OT reporter, a Wnt signaling reporter (25) which does not respond to Cdx1 alone. It is also interesting to note that LEF1 has been suggested to participate in an autoregulatory loop for the melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor (MITF-M) (52) in a manner reminiscent of our proposed mechanism of Cdx1 autoregulation.

In the canonical Wnt pathway, LEF1 serves to recruit  $\beta$ -catenin which plays a pivotal role in transcriptional activation (reviewed in (43). In this regard, Alx4 - LEF1 functional interaction is  $\beta$ -catenin dependent whereas MITF-M - LEF1 is not (4,52). As Cdx1 harbors a transcription activation domain, it is conceivable that its interaction with LEF1 could obviate the necessity of  $\beta$ -catenin for transcriptional regulation. However, the synergistic interaction between *Cdx1* mutant and *Wnt3a<sup>vt</sup>* alleles suggest that, on the *Cdx1* promoter, the Cdx1/LEF1 interaction is  $\beta$ -catenin dependent. Moreover, immunoprecipitation assays revealed that Cdx1 associates with a LEF1- $\beta$ -catenin complex (our unpublished observation), and therefore Cdx1 binding to LEF1 does not preclude LEF1- $\beta$ -catenin interaction. Nonetheless, we cannot exclude the possibility that some

genes may be regulated by a Cdx1-LEF1 complex in a  $\beta$ -catenin-independent manner.

### **Cdx-Wnt interactions in vertebral patterning.**

Our analysis of *Wnt3a<sup>vt</sup>-Cdx1* compound mutants supports a role for LEF1-Cdx1 interactions in Cdx1 autoregulation. While the convergent effect of loss of Cdx1 and Wnt3a function on *Cdx1* expression could be mediated through two independent processes, our present data suggest that Cdx1-LEF1 interaction, operating through proximal LEF/TCF response elements (39,50) mediates this interaction. Indeed, the ability of Cdx1 to augment LEF1-dependent transcription was seen on both the natural *Cdx1* promoter as well as the synthetic Wnt-responsive pGL3-OT reporter, which does not respond to Cdx1 alone.

In *Cdx1-Wnt3a<sup>vt</sup>* mutants, attenuation of Cdx1 and Wnt signaling would lead to a reduction, below a critical level, in Cdx1-LEF/TCF complexes on the *Cdx1* promoter. This hypothetical outcome is clearly reflected by the near-complete loss of expression of *Cdx1* in the *Cdx1<sup>+/-</sup> - Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* compound mutants at E8.5. The residual *Cdx1* expression in this background was likely due to the nature of the *Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* allele, which is a weak hypomorph (24). This model is also supported by relative effects of these mutant backgrounds on vertebral patterning. Indeed, *Cdx<sup>+/-</sup> - Wnt3a<sup>vt/vt</sup>* alleles exhibited synergistic interaction that was more pronounced from the second cervical vertebra and more caudal, whereas there was little increase in defects of more rostral elements. This is consistent with a role for Wnt3a signaling impacting on *Cdx1* shortly after its initial onset of expression (and normal patterning of rostral vertebrae) with subsequent failure of autoregulation leading to defects of more posterior vertebrae.

### **HMG-box proteins as Cdx partners; a general paradigm?**

Cdx-HMG interactions might contribute to regulatory interactions in addition to Cdx1 autoregulation. As Cdx homeodomains and LEF/TCF HMG-boxes are highly conserved, it is conceivable that other such interactions do,

indeed, occur. In this regard, a Cdx2-Tcf4 interaction might explain the inhibitory effect of Cdx2 on the *Cdx1* promoter in colon cancer cells (16). Indeed, this outcome requires the Cdx2 homeodomain and occurs in the absence of demonstrated Cdx2 binding sites on the *Cdx1* promoter (16). LEF1 and TCF1, as well as Cdx2, are also involved in events related to posterior specification (8,21,61) suggesting an additional pathway(s) in which these transcription factors may interact.

In an attempt to identify other potentially relevant HMG-box - Cdx1 interactions, we investigated the ability of SRY HMG-box-related proteins (Sox) family members to interact with Cdx1, and found that Cdx1 could associate with Sox2 *in vitro*. In contrast to Sox2, Sox9 did not interact with Cdx1. In this regard, vertebrate Sox1, Sox2 and Sox3 form a subdivision of the SOX family, the B1 group, based on HMG box sequence similarity (12,53). As our current findings suggest a role for HMG box sequences in association with Cdx1, these data indicate that the Cdx1-Sox2 interaction is likely reliant on specific HMG sequences. In addition, Cdx members exhibit highly conserved homeodomains, and Cdx1 and 2 have overlapping functions in antero-posterior patterning (61). It is therefore tempting to speculate that all Cdx members have the potential to interact with members of the B1 group of SOX proteins, and that Cdx/HMG-box interactions may be involved in a number of ontogenic programs. In this regard *Sox2* is expressed in a partially overlapping manner with *Cdx1* in the neurectoderm and with the chick *Cdx2* homologue, *CdxA*, in the developing gut (32,33,42,64). While there is presently no indication that Sox2 has a role in gut development, studies in *Xenopus* suggest a function for both Sox2 and Xcad3 (the *Xenopus Cdx4* homologue) in the neurectoderm (31,36,48). Analysis of Cdx1-Cdx2 compound mutant mice, and recent studies in the chick embryo, also suggest a role for Cdx in regulating *Hox* gene expression in the neurectoderm (3,61). Given that Sox2 is an important regulator of *Hoxb1* expression in the hindbrain (15), it is tempting to hypothesize that the Cdx - Sox2 interactions may play critical roles in development of the CNS.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Drs L. Attisano, A. Hecht, D. Rimm, B. Vogelstein and M. Featherstone for their kind gifts of several of the plasmids used in this study, as well as Nathalie Bouchard for technical assistance. This work was supported by grants to D.L. from the Canadian Institutes for Health Research. N.P. is a recipient of a fellowship from CIHR and M.H. was supported by a studentship from the Medical Research Council of Canada. D.L. is a Senior scholar of the Fonds de la Recherches en Santé de Québec.

## References

1. **Allan, D., M. Houle, N. Bouchard, B. I. Meyer, P. Gruss, and D. Lohnes.** 2001. RAR gamma and Cdx1 interactions in vertebral patterning. *Developmental Biology* **240**:46-60.
2. **Beck, F., T. Erler, A. Russell, and R. James.** 1995. Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev.Dyn.* **204**:219-227.
3. **Bel-Vialar, S., N. Itasaki, and R. Krumlauf.** 2002. Initiating Hox gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Development* **129**:5103-5115.
4. **Boras, K. and P. A. Hamel.** 2002. Alx4 binding to LEF-1 regulates N-CAM promoter activity. *Journal of Biological Chemistry* **277**:1120-1127.
5. **Burke, A. C., C. E. Nelson, B. A. Morgan, and C. Tabin.** 1995. Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. *Development* **121**:333-346.
6. **Calogero, S., F. Grassi, A. Aguzzi, T. Voigtlander, P. Ferrier, S. Ferrari, and M. E. Bianchi.** 1999. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat.Genet.* **22**:276-280.
7. **Charite, J., W. de Graaff, D. Consten, M. J. Reijnen, J. Korving, and J. Deschamps.** 1998. Transducing positional information to the Hox genes: critical interaction of cdx gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* **125**:4349-4358.
8. **Chawengsaksophak, K., R. James, V. E. Hammond, F. Kontgen, and F. Beck.** 1997. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* **386**:84-87.
9. **Chen, F., J. Greer, and M. R. Capecchi.** 1998. Analysis of Hoxa7/Hoxb7 mutants suggests periodicity in the generation of the different sets of vertebrae. *Mech.Dev.* **77**:49-57.
10. **Cho, E. A. and G. R. Dressler.** 1998. TCF-4 binds beta-catenin and is expressed in distinct regions of the embryonic brain and limbs. *Mech.Dev.* **77**:9-18.
11. **Christ, B. and C. P. Ordahl.** 1995. Early stages of chick somite development [Review]. *Anatomy & Embryology* **191**:381-396.



12. **Collignon, J., S. Sockanathan, A. Hacker, M. Cohen-Tannoudji, D. Norris, S. Rastan, M. Stevanovic, P. N. Goodfellow, and R. Lovell-Badge.** 1996. A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* **122**:509-520.
13. **Condie, B. G. and M. R. Capecchi.** 1993. Mice homozygous for a targeted disruption of Hoxd-3 (Hox-4.1) exhibit anterior transformations of the first and second cervical vertebrae, the atlas and the axis. *Development* **119**:579-595.
14. **Deschamps, J. and M. Wijgerde.** 1993. Two phases in the establishment of HOX expression domains. *Dev.Biol.* **156**:473-480.
15. **Di Rocco, G., A. Gavalas, H. Popperl, R. Krumlauf, F. Mavilio, and V. Zappavigna.** 2001. The recruitment of SOX/OCT complexes and the differential activity of HOXA1 and HOXB1 modulate the Hoxb1 auto-regulatory enhancer function. *Journal of Biological Chemistry* **276**:20506-20515.
16. **Domon-Dell, C. and J. N. Freund.** 2002. Stimulation of Cdx1 by oncogenic beta-catenin/Tcf4 in colon cancer cells; opposite effect of the CDX2 homeoprotein. *FEBS Lett.* **518**:83-87.
17. **Duboule, D.** 1998. Vertebrate hox gene regulation: clustering and/or colinearity? *Curr.Opin.Genet.Dev.* **8**:514-518.
18. **Duboule, D. and P. Dolle.** 1989. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. *EMBO J.* **8**:1497-1505.
19. **Favier, B., F. M. Rijli, C. Fromental-Ramain, V. Fraulob, P. Chambon, and P. Dolle.** 1996. Functional cooperation between the non-paralogous genes Hoxa-10 and Hoxd-11 in the developing forelimb and axial skeleton. *Development* **122**:449-460.
20. **Ferrier, D. E. K. and P. W. H. Holland.** 2001. Ancient origin of the Hox gene cluster [Review]. *Nature Reviews Genetics* **2**:33-38.
21. **Galceran, J., I. Farinas, M. J. Depew, H. Clevers, and R. Grosschedl.** 1999. Wnt3a-/- like phenotype and limb deficiency in Lef1(-/-)Tcf1(-/-) mice. *Genes Dev* **13**:709-717.
22. **Gamer, L. W. and C. V. Wright.** 1993. Murine Cdx-4 bears striking similarities to the Drosophila caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech.Dev.* **43**:71-81.
23. **Gaunt, S. J.** 1994. Conservation in the Hox code during morphological evolution. *Int.J.Dev.Biol.* **38**:549-552.

24. **Greco, T. L., S. Takada, M. M. Newhouse, J. A. McMahon, A. P. McMahon, and S. A. Camper.** 1996. Analysis of the vestigial tail mutation demonstrates that Wnt-3a gene dosage regulates mouse axial development. *Genes Dev.* **10**:313-324.
25. **He, T. C., A. B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L. T. da Costa, P. J. Morin, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler.** 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**:1509-1512.
26. **Hecht, A. and M. P. Stemmler.** 2003. Identification of a promoter-specific transcriptional activation domain at the C terminus of the Wnt effector protein T-cell factor 4. *J.Biol.Chem.* **278**:3776-3785.
27. **Horan, G. S., R. Ramirez-Solis, M. S. Featherstone, D. J. Wolgemuth, A. Bradley, and R. R. Behringer.** 1995. Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev.* **9**:1667-1677.
28. **Houle, M., P. Prinos, A. Iulianella, N. Bouchard, and D. Lohnes.** 2000. Retinoic acid regulation of *Cdx1*: an indirect mechanism for retinoids and vertebral specification. *Mol.Cell Biol.* **20**:6579-6586.
29. **Houle, M., J.-R. Sylvestre, and D. Lohnes.** 2003. Retinoic acid regulates a subset of *Cdx1* function in vivo.(submitted)
30. **Ikeya, M. and S. Takada.** 2001. Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of *cdx-1* expression. *Mech.Dev* **103**:27-33.
31. **Isaacs, H. V., M. E. Pownall, and J. M. Slack.** 1998. Regulation of Hox gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue *Xcad3*. *EMBO J.* **17**:3413-3427.
32. **Ishii, Y., K. Fukuda, H. Saiga, S. Matsushita, and S. Yasugi.** 1997. Early specification of intestinal epithelium in the chicken embryo: a study on the localization and regulation of *CdxA* expression. *Development Growth & Differentiation* **39**:643-653.
33. **Ishii, Y., M. Rex, P. J. Scotting, and S. Yasugi.** 1998. Region-specific expression of chicken *Sox2* in the developing gut and lung epithelium: regulation by epithelial-mesenchymal interactions. *Dev.Dyn.* **213**:464-475.

34. **Kessel, M. and P. Gruss.** 1991. Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* **67**:89-104.
35. **Kieny, M., A. Mauger, and P. Sengel.** 1972. Early regionalization of somitic mesoderm as studied by the development of axial skeleton of the chick embryo. *Dev.Biol.* **28**:142-161.
36. **Kishi, M., K. Mizuseki, N. Sasai, H. Yamazaki, K. Shiota, S. Nakanishi, and Y. Sasai.** 2000. Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* **127**:791-800.
37. **Korinek, V., N. Barker, K. Willert, M. Molenaar, J. Roose, G. Wagenaar, M. Markman, W. Lamers, O. Destree, and H. Clevers.** 1998. Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol.Cell Biol.* **18**:1248-1256.
38. **Lecuyer, E., S. Herblot, M. Saint-Denis, R. Martin, C. G. Begley, C. Porcher, S. H. Orkin, and T. Hoang.** 2002. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* **100**:2430-2440.
39. **Lickert, H., C. Domon, G. Huls, C. Wehrle, I. Duluc, H. Clevers, B. I. Meyer, J. N. Freund, and R. Kemler.** 2000. Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene *Cdx1* in embryonic intestine. *Development* **127**:3805-3813.
40. **Lickert, H. and R. Kemler.** 2002. Functional analysis of cis-regulatory elements controlling initiation and maintenance of early *Cdx1* gene expression in the mouse. *Dev.Dyn.* **225**:216-220.
41. **Ma, Y., K. Certel, Y. Gao, E. Niemitz, J. Mosher, A. Mukherjee, M. Mutsuddi, N. Huseinovic, S. T. Crews, W. A. Johnson, and J. R. Nambu.** 2000. Functional interactions between *Drosophila* bHLH/PAS, Sox, and POU transcription factors regulate CNS midline expression of the slit gene. *J.Neurosci.* **20**:4596-4605.
42. **Meyer, B. I. and P. Gruss.** 1993. Mouse *Cdx-1* expression during gastrulation. *Development* **117**:191-203.
43. **Moon, R. T., B. Bowerman, M. Boutros, and N. Perrimon.** 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* **296**:1644-1646.
44. **Nordeen, S. K.** 1988. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques* **6**:454-458.

45. **Nowicki, J. L. and A. C. Burke.** 2000. Hox genes and morphological identity: axial versus lateral patterning in the vertebrate mesoderm. *Development* **127**:4265-4275.
46. **Oosterveen, T., K. Niederreither, P. Dolle, P. Chambon, F. Meijlink, and J. Deschamps.** 2003. Retinoids regulate the anterior expression boundaries of 5' Hoxb genes in posterior hindbrain. *EMBO J.* **22**:262-269.
47. **Oosterwegel, M., W. M. van De, J. Timmerman, A. Kruisbeek, O. Destree, F. Meijlink, and H. Clevers.** 1993. Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development* **118**:439-448.
48. **Pownall, M. E., A. S. Tucker, J. M. Slack, and H. V. Isaacs.** 1996. eFGF, Xcad3 and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. *Development* **122**:3881-3892.
49. **Prieve, M. G., K. L. Guttridge, J. E. Munguia, and M. L. Waterman.** 1996. The nuclear localization signal of lymphoid enhancer factor-1 is recognized by two differentially expressed Srp1-nuclear localization sequence receptor proteins. *J.Biol.Chem.* **271**:7654-7658.
50. **Prinos, P., S. Joseph, K. Oh, B. I. Meyer, P. Gruss, and D. Lohnes.** 2001. Multiple pathways governing Cdx1 expression during murine development. *Dev.Biol.* **239**:257-269.
51. **Roelen, B. A., W. de Graaff, S. Forlani, and J. Deschamps.** 2002. Hox cluster polarity in early transcriptional availability: a high order regulatory level of clustered Hox genes in the mouse. *Mech.Dev.* **119**:81.
52. **Saito, H., K. Yasumoto, K. Takeda, K. Takahashi, A. Fukuzaki, S. Orihara, and S. Shibahara.** 2002. Melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform activates its own gene promoter through physical interaction with lymphoid-enhancing factor 1. *J.Biol.Chem.* **277**:28787-28794.
53. **Schepers, G. E., R. D. Teasdale, and P. Koopman.** 2002. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev.Cell* **3**:167-170.
54. **Silberg, D. G., G. P. Swain, E. R. Suh, and P. G. Traber.** 2000. Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology* **119**:961-971.
55. **Soriano, N. S. and S. Russell.** 1998. The *Drosophila* SOX-domain protein Dichaete is required for the development of the central nervous system midline. *Development* **125**:3989-3996.

56. **Subramanian, V., B. I. Meyer, and P. Gruss.** 1995. Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* **83**:641-653.
57. **Takada, S., K. L. Stark, M. J. Shea, G. Vassileva, J. A. McMahon, and A. P. McMahon.** 1994. Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev* **8**:174-189.
58. **Taylor, J. K., T. Levy, E. R. Suh, and P. G. Traber.** 1997. Activation of enhancer elements by the homeobox gene *Cdx2* is cell line specific. *Nucleic Acids Res.* **25**:2293-2300.
59. **Trinh, K. Y., T. Jin, and D. J. Drucker.** 1999. Identification of domains mediating transcriptional activation and cytoplasmic export in the caudal homeobox protein *Cdx-3*. *J.Biol.Chem.* **274**:6011-6019.
60. **Tutter, A. V., C. J. Fryer, and K. A. Jones.** 2001. Chromatin-specific regulation of LEF-1-beta-catenin transcription activation and inhibition in vitro. *Genes & Development* **15**:3342-3354.
61. **van den Akker, E., S. Forlani, K. Chawengsaksohak, W. de Graaff, F. Beck, B. I. Meyer, and J. Deschamps.** 2002. *Cdx1* and *Cdx2* have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* **129**:2181-2193.
62. **Vleminckx, K., R. Kemler, and A. Hecht.** 1999. The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/beta-catenin complex in *Xenopus laevis*. *Mech.Dev.* **81**:65-74.
63. **Wodarz, A. and R. Nusse.** 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **14**:59-88.
64. **Wood, H. B. and V. Episkopou.** 1999. Comparative expression of the mouse *Sox1*, *Sox2* and *Sox3* genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mech.Dev.* **86**:197-201.
65. **Zappavigna, V., L. Falciola, M. Helmer-Citterich, F. Mavilio, and M. E. Bianchi.** 1996. HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO J.* **15**:4981-4991.

## **CHAPITRE 3**

### **ARTICLE**

#### **COUP-TF members repress RA-induced *Cdx1* expression**

Mélanie Béland<sup>1,2</sup>, et David Lohnes<sup>1,2,3,\*</sup>

- 1- Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins ouest, Montréal, Québec, Canada, H2W 1R7.
- 2- Département de Biologie Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
- 3- Département de Médecine Expérimentale, Université McGill, Montréal, Québec, Canada.

**Article soumis pour publication dans Journal of Biological Chemistry**

### 3.1 Avant-propos

L'article présenté dans la section suivante s'intitule « COUP-TF members repress RA-induced *Cdx1* expression ». Les auteurs sont Mélanie Béland et David Lohnes. Cet article a été soumis pour publication dans Journal of Biological Chemistry en novembre 2004. Il décrit une série d'expériences effectuées entre septembre 2000 et juillet 2004. Tous les résultats présentés dans cet article ont été réalisés à partir de mes travaux de recherche, avec l'approbation de mon directeur de recherche. Les séquences encodant COUP-TFI et COUP-TFII ont été fournies par Dr M.J. Tsai.

### 3.2 Manuscript

#### Summary

It is well established that *Hox* genes are key players in specifying positional identity along the anterior-posterior axis, and are targets of diverse transcription factors implicated in axial patterning. Members of the Cdx family (Cdx1, 2 and 4) are among such effectors of *Hox* expression as pertains to vertebral patterning. *Cdx* members are themselves targets of signalling molecules that are also implicated in axial patterning, including retinoic acid (RA) and certain members of Wnt and FGF families. In this regard, we have previously shown that *Cdx1* is directly regulated by retinoic acid (RA) at the late primitive streak stage (embryonic day (E) 7.5) through an RA response element (RARE) in the proximal *Cdx1* promoter. At E8.5, *Cdx1* expression remains essentially limited to the posterior embryo. RA, however, is excluded from the caudal embryo at this later stage, but is found in a more anterior domain encompassing the prospective trunk region. These observations suggest the existence of a repressor mechanism which prevents expression of *Cdx1* in these anterior domains of retinoid signaling at E8.5. In the present study, we present evidence suggesting that COUP-TF members antagonize RA-induced *Cdx1* expression by competing with RXR-RAR heterodimers for binding to the *Cdx1* RARE. Consistent with this, *in situ* hybridization analysis revealed that COUP-TFs are highly expressed in the anterior embryo in domains where *Cdx1* transcripts are excluded. Together with other data, these findings suggest a model by which COUP-TF expression is induced by RA in the trunk region as a negative feedback mechanism to restrict *Cdx1* expression to the caudal embryo.



## Introduction

The *Cdx* family (*Cdx1*, 2 and 4) encode homeodomain transcription factors. A role for *Cdx1* and *Cdx2* in vertebral patterning has been clearly demonstrated by gene targeting studies. *Cdx1*<sup>-/-</sup> (1) and *Cdx2*<sup>+/-</sup> (2) mice exhibit homeotic transformations of the cervical and anterior thoracic vertebrae. *Cdx1*<sup>-/-</sup>/*Cdx2*<sup>+/-</sup> compound mutant offspring exhibit a higher degree of expressivity of these transformations suggesting that both gene products functionally overlap (3).

*Cdx1* and *Cdx2* appear to impact on vertebral patterning, at least in part, through regulation of *Hox* gene expression (1,3). Consistent with this, the vertebral defects seen in *Cdx* mutant offspring are reminiscent of those observed in certain *Hox* mutants. Moreover, the vertebral homeosis seen in *Cdx* mutants are typically associated with a posterior shift in the anterior expression domains of several *Hox* genes. A number of *Hox* promoters also contain consensus *Cdx* binding motifs (1), at least some of which have been demonstrated to be functional *in vivo* (4). Finally, *Cdx1* transcripts are first detected at embryonic day 7.5 (E7.5) in the mesodermal and ectodermal cells of the primitive streak (5), and this expression is maintained at tailbud stages through E9.5. This pattern of expression is consistent with the onset of *Hox* gene expression in the caudal embryo.

We have previously demonstrated that *Cdx1* is regulated at E7.5 by retinoic acid (RA) present in the late primitive streak region through an atypical RA response element (RARE) (6;7). By E8.5, *Cdx1* expression is maintained in the caudal embryo through mechanisms involving both Wnt signaling (8) and an autoregulation loop (9). RA, however, is absent in this region at this stage, but is found in a more anterior domain in the prospective trunk (10). Despite this, *Cdx1* transcripts are not observed (with the exception of later expression in the dermamyotome and limb buds) in the embryonic trunk. This observation suggests the existence of a mechanism which serves to attenuate *Cdx1* expression in these more anterior, RA-positive, tissues.

Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFI and COUP-TFII) are orphan nuclear receptors (11-13). COUP-TFs have been

shown to interfere with many nuclear receptor signaling pathways including the RARs (14-18). This antagonism has been suggested to occur by four different mechanisms: (i) competition for RXR heterodimerization; (ii) trans-repression *via* interaction with the ligand binding domain of RAR, TR or RXR; (iii) active repression through interaction with co-repressors, and; (iv) competition for DNA binding at response elements (19).

Based on their ability to interfere with retinoid signaling, we investigated whether COUP-TFs could act as negative regulators of *Cdx1* expression. Consistent with such a relationship, *in situ* hybridization analysis revealed that *Cdx1* expression was restricted to regions where COUP-TF transcripts were excluded. Moreover, we found that COUP-TFs could attenuate RA-induced transcriptional activation of the *Cdx1* promoter in tissue culture, and that this effect was dependent upon the DNA binding domain of COUP-TF1. We also demonstrated that COUP-TFs can bind the *Cdx1* RARE and repress transactivation from this element from an heterologous promoter. Finally, we found that increased expression of COUP-TF1 correlated with loss of expression of endogenous *Cdx1*. Together these results led us to propose a model in which RA induces expression of COUP-TFs in the trunk region of the E8.5 embryo which serves to attenuate *Cdx1* expression in the embryonic trunk, thus restricting *Cdx1* expression to the caudal embryo.

## Experimental Procedures

**Plasmid constructs.** The luciferase reporter vector containing 2Kb of the *Cdx1* promoter or a heterologous basal promoter harbouring the *Cdx1* RARE have been described previously (6). Murine COUP-TFI and COUP-TFII cDNAs, generously provided by Dr.Ming-Jer Tsai, were subcloned into a modified version of pSG5 (Stratagene) harbouring an extended polylinker. The COUP-TFI  $\Delta$ DBD mutant was generated by PCR-mediated deletion of nucleotides 565 to 621 (NCBI accession number: X74134), which encode the first zinc finger of the COUP-TFI DNA-binding domain.

**Cell culture and transfection analysis.** F9 embryocarcinoma cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. For transient transfection assays, cells were passed into gelatinized 6-well plates and transfected using the calcium phosphate precipitation method. Each transfection consisted of 1  $\mu$ g of luciferase reporter construct, 0.05  $\mu$ g - 0.5  $\mu$ g of relevant expression vector(s), and empty expression vector (where required) such that all transfections contained a total of 1.5  $\mu$ g of DNA. The following day media was replenished, cells were treated with 1  $\mu$ M RA or vehicle (DMSO; final concentration 0.01% v/v) and culture continued for another 24 hrs. Monolayers were then rinsed with PBS, cells disrupted by addition of lysis buffer (0.1 M Tris pH8, 1% Igepal, 1 mM DTT), and lysates assessed for luciferase activity as described previously (6).

P19 embryocarcinoma cells were grown in  $\alpha$ -minimal essential medium supplemented with 2.5% fetal bovine serum and 7.5% donor bovine serum in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Cells were passaged into 100-mm tissue culture plates, transfected with 25  $\mu$ g of DNA per plate and treated with RA or vehicle as for F9 cells. In some experiments, pEGFP-F (Clontech) was co-transfected with relevant expression vectors and GFP-positive cells isolated by Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) 24 hours post-treatment. Cells were harvested, snap frozen and stored at -80°C prior to RNA extraction. COS7 cells were maintained and transfected as for P19 cells and used for the isolation of nuclear

proteins for electrophoretic mobility shift assay studies as described previously (6).

**Electrophoretic mobility shift assay (EMSA).** Oligonucleotide probe sequences corresponding to the wild type (WT) or a mutated *Cdx1* RARE incapable of receptor association, an SP-1 binding motif, as well as conditions for binding reactions have been described previously (6). In some experiments, 1-2  $\mu$ g of either anti-COUP-TFI (sc-6577X, Santa Cruz) or anti-COUP-TFII (sc-6576, Santa Cruz) antibodies were included in the binding reaction for supershift analysis.

***In situ* hybridization.** Whole-mount *in situ* hybridization was performed on E8.0 – E8.75 embryos as described (20) using riboprobes generated from *Cdx1* or COUP-TF cDNAs.

**Northern blot analysis.** Total RNA was extracted from P19 cells using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, resolved by electrophoresis through a formaldehyde gel and transferred to a Magna membrane (Osmonics Inc.). Hybridizations were performed overnight at 65°C in 6X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS, 30 mg/mL yeast RNA, 200  $\mu$ g/mL of denatured salmon sperm DNA and approximately  $10^6$  cpm/ml of probe which was prepared by random priming with relevant cDNAs. Blots were washed twice at 65°C in 2X SSC/ 0.1% SDS and signal revealed by autoradiography.

## Results

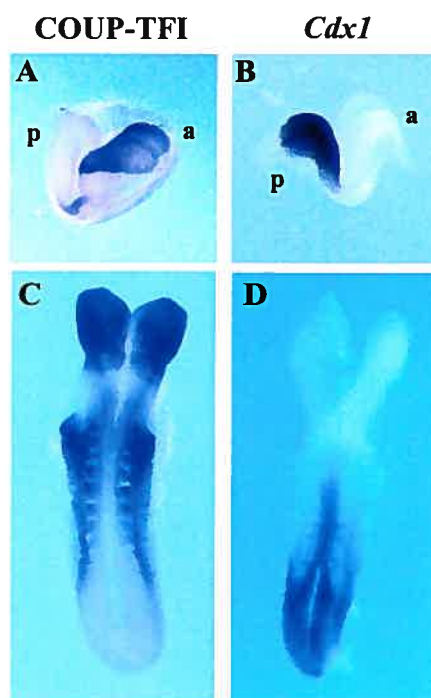
### **COUP-TFI and *Cdx1* exhibit complementary patterns of expression.**

In order to begin to establish whether COUP-TFs could function as negative regulators of *Cdx1* expression, we first examined the expression patterns of each gene. Whole-mount *in situ* hybridization analysis revealed COUP-TFI expression at E8.0 in the anterior prospective nervous system (Fig. 3-1A), with expression extending caudally as elongation proceeded at E8.75 (Fig. 3-1C). *COUP-TFI* transcripts, however, were never detected in the tail bud region. Similar patterns of expression were also observed for *COUP-TFII* (data not shown). By contrast, expression of *Cdx1* was observed exclusively in the prospective neural tube to the level of the caudal hindbrain and in a broad region throughout the posterior embryo at E8.0, with expression restricted to the neural tube and tail bud regions at E8.75 (Fig. 3-1B and D). Thus, *Cdx1* expression was restricted to regions where transcripts encoding COUP-TFs were excluded, in agreement with a possible role for COUP-TFs as negative regulators of *Cdx1*.

### **COUP-TFs interfere with induction of *Cdx1* by RA and bind the *Cdx1* RARE.**

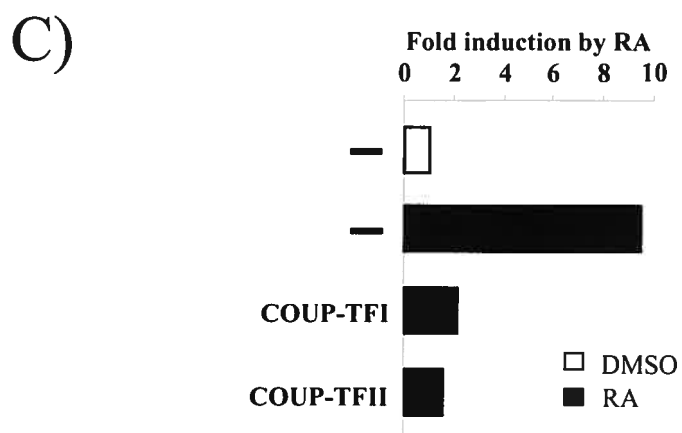
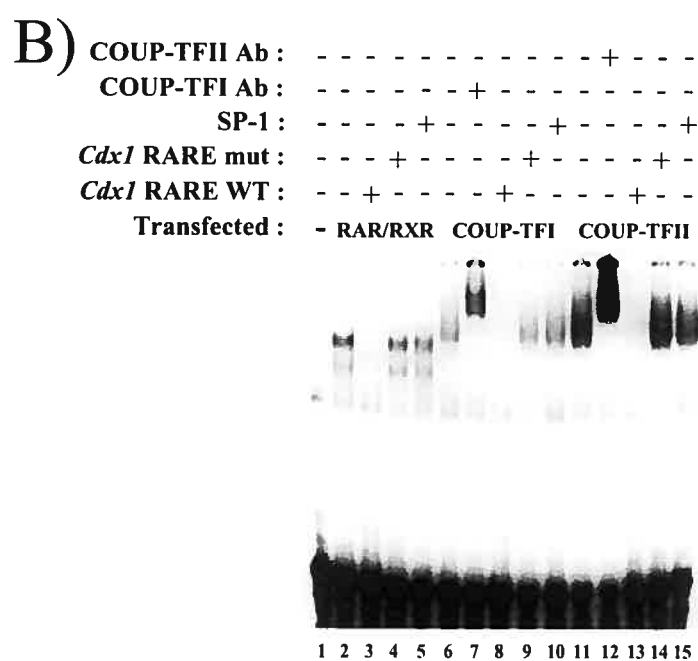
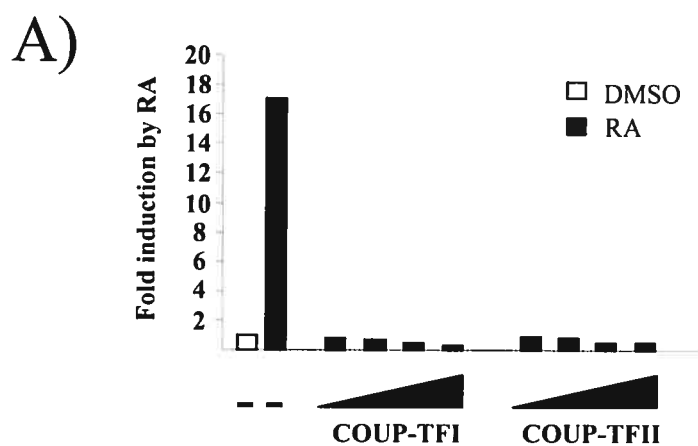
To assess whether COUP-TF members could antagonize the induction of *Cdx1* by RA, we transfected F9 cells with a reporter gene under the control of *Cdx1* promoter sequences, including the RARE, and cultured the cells in the absence or presence of RA (1 $\mu$ M). As shown in Figure 3-2A, RA treatment resulted in an induction of reporter activity, consistent with previous findings (6). Moreover, co-transfection of the reporter with increasing amounts of an expression vector encoding COUP-TFI or COUP-TFII resulted in a complete attenuation of this induction.

COUP-TFs have been shown to exert their repressor function through several mechanisms, including competition for occupancy of hormone response elements. We therefore investigated whether COUP-TFs could bind to the *Cdx1* RARE. To this end, nuclear extracts from COS7 cells transfected with COUP-TFI



**Figure 3-1:** *Cdx1* and *COUP-TFI* exhibit complementary patterns of expression. Whole-mount *in situ* hybridization analysis of *COUP-TFI* (A and C) and *Cdx1* (B and D) expression in E8.0 (A and B) and E8.75 (C and D) mouse embryos. a, anterior; p, posterior.

**Figure 3-2:** COUP-TFs antagonize induction of *Cdx1* by RA and bind the *Cdx1* RARE. A) F9 cells were transfected with a luciferase reporter gene under the control of the 2Kb *Cdx1* promoter with or without 50 – 500 ng of COUP-TFI or II expression vector, and cultured in the absence or presence of RA (1 $\mu$ M) for 24 hours. Luciferase values are expressed as fold induction by RA relative to the reporter vector alone. B) Nuclear extracts from COS7 cells, transfected with the indicated expression vectors, were incubated with a radiolabeled oligonucleotide probe corresponding to the *Cdx1* RARE and complexes resolved by PAGE. Lane 1, mock-transfected cells; lanes 2-5, RAR and RXR; lanes 6-10, COUP-TFI; lanes 11-15, COUP-TFII. Specific complexes (lanes 2, 6 and 11) were not affected by inclusion of an SP-1 non-specific competitor (lanes 5, 10 and 15) or a mutated *Cdx1* RARE (lanes 4, 9 and 14) but were competed for by WT *Cdx1* RARE (lanes 3, 8 and 13). Supershifts were observed after incubation with anti-COUP-TFI (lane 7) and anti-COUP-TFII (lane 12). C) F9 cells were transfected with a luciferase reporter vector containing the *Cdx1* RARE motif upstream of the thymidine kinase minimal promoter (TK109) alone or with 500 ng of COUP-TFI or II expression vector. Cultures were treated with vehicle or RA and luciferase activity assessed 24 hours post-treatment. Results are expressed as fold induction by RA relative to the reporter vector alone.





or II were incubated with a radiolabelled probe consisting of the *Cdx1* RARE sequence. Nuclear extracts from cells transfected with RAR $\gamma$  plus RXR $\alpha$  were used as a positive control, since RAR-RXR heterodimers have been shown to bind efficiently to this element (6). The results, illustrated in Figure 3-2B, indicate that both COUP-TFI and II formed a complex with the *Cdx1* RARE (lanes 6 and 11) that was comparable to, or greater than, the complex formed using RXR-RAR (lane 2). The presence of COUP-TFI or II in each complex was confirmed by supershift assays using the appropriate antibodies (lanes 7 and 12). Specificity of binding was further established by efficient competition with an unlabeled RARE probe (lanes 8 and 13) whereas a mutated *Cdx1* RARE (lanes 9 and 14) or an SP-1 binding motif (lanes 10 and 15) were unable to compete.

The above results demonstrated that COUP-TFs can bind directly to the *Cdx1* RARE. To determine whether this interaction could inhibit *Cdx1* expression, we assessed the effect of COUP-TFs on RA-induction from an heterologous promoter containing the *Cdx1* RARE. As shown in Figure 3-2C, both COUP-TFI and COUP-TFII repressed RA-induced transcriptional activity from this reporter.

### **DNA binding by COUP-TFI is necessary to repress *Cdx1*.**

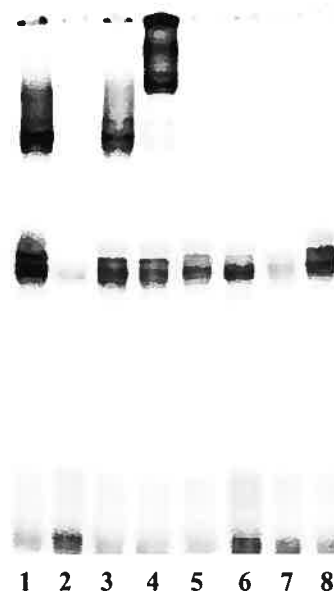
Mutation of the RARE abrogates induction of *Cdx1* by RA (6). However, a similar strategy would not be informative as a means to investigate the role of COUP-TFs, as these factors attenuate RA-induction through this element, but do not interfere with basal expression. As an alternative approach, we assessed the ability of a COUP-TFI mutant lacking the first zinc finger motif of its DNA binding domain (COUP-TFI $\Delta$ DBD) to impact on *Cdx1* expression.

EMSA demonstrated that, in contrast to COUP-TFI, COUP-TFI $\Delta$ DBD could not effectively bind the *Cdx1* RARE (Fig. 3-3A, lane 6). This finding is consistent with prior work demonstrating the importance of this zinc finger motif for DNA binding by other members of the steroid hormone receptor superfamily (21). We next tested the ability of the COUP-TFI $\Delta$ DBD mutant to repress RA-induced activation of the *Cdx1* promoter in F9 cells. As illustrated in Figure 3B,

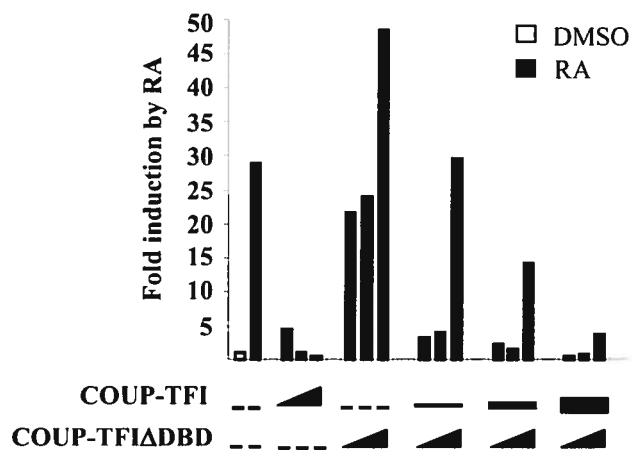
**Figure 3-3:** COUP-TFI inhibition of *Cdx1* is dependent on DNA binding. A) Nuclear extracts from COS7 cells were incubated with a radiolabeled oligonucleotide probe corresponding to the *Cdx1* RARE. Lanes 1-4, transfected with COUP-TFI; lanes 5-8, transfected with COUP-TFI $\Delta$ DBD. Note that, unlike COUP-TFI (lane 1), COUP-TFI $\Delta$ DBD was unable to form a specific complex with the RARE (lane 5). B) F9 cells were transfected with a luciferase reporter gene under the control of the 2Kb *Cdx1* promoter in the absence or presence of RA (1 $\mu$ M). 50, 100 or 500ng of COUP-TFI and/or COUP-TFI $\Delta$ DBD expression vector(s) were used in co-transfection experiments. Results are expressed as fold induction by RA relative to the reporter vector alone.

A)

COUP-TFI Ab : - - - + - - - +  
*Cdx1* RARE mut : - - + - - - + -  
*Cdx1* RARE WT : - + - - - + - -  
 Transfected : COUP-TFI WT COUP-TFI  $\Delta$ DBD



B)



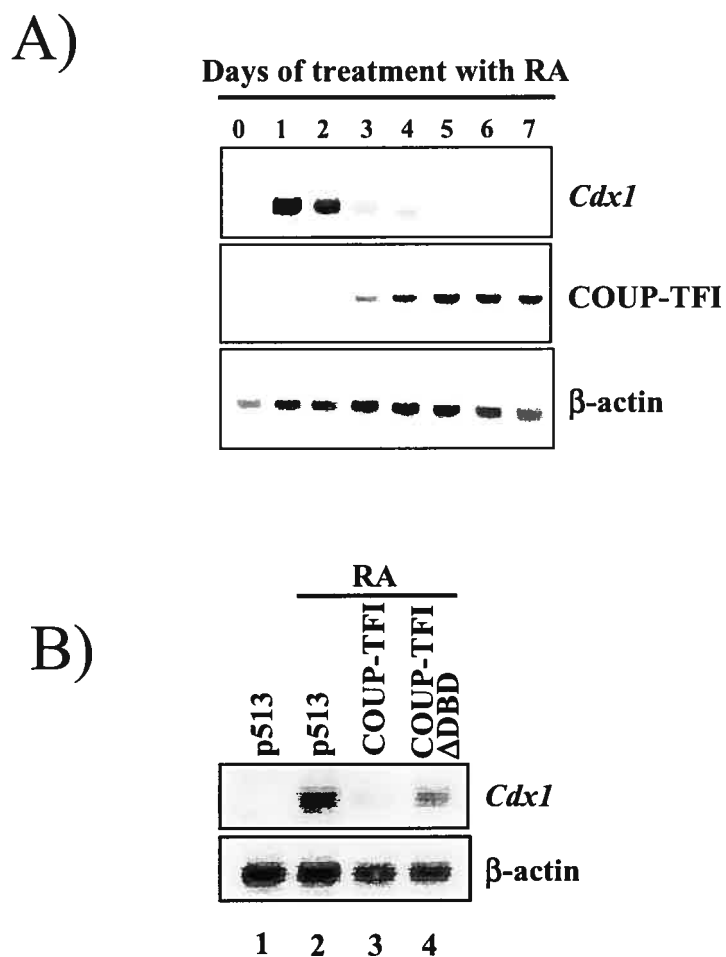
the COUP-TFI $\Delta$ DBD mutant failed to inhibit RA-mediated activation of the *Cdx1* promoter. Similar findings were also observed with the RARE directing expression from an heterologous promoter (data not shown).

The relative mobility of the complex formed between COUP-TF and the *Cdx1* RARE, compared to the RXR-RAR-RARE complex, suggested that COUP-TFs bind this motif as homodimers. Consistent with this, we found that co-expression COUP-TFI $\Delta$ DBD was able to relieve the transcriptional repression mediated by its wild type counterpart in a dose dependant manner (Figure 3-3B). This suggests that the interaction of COUP-TFI with COUP-TFI $\Delta$ DBD prevented DNA-binding and inhibition of RA-induced transactivation by the former, and further supports the contention that COUP-TFs inhibit RA-induction of *Cdx1* by direct association with the RARE.

#### **RA induction of COUP-TFI leads to down-regulation of *Cdx1* expression.**

In addition to negatively regulating the expression of certain RA target genes, COUP-TFIs have themselves been demonstrated to be RA targets (12,22,23). This finding has led to the hypothesis that COUP-TFs are involved in a negative feedback mechanism which serves to repress the expression of RA target genes (23). In order to examine this relationship, P19 cells were cultured in the continual presence 1 $\mu$ M RA and expression of *COUP-TFI* and *Cdx1* assessed from one to seven days. Northern blot analysis (Fig. 3-4A) revealed that *COUP-TFI* was first detected two days after RA treatment, with transcripts accumulating to a maximum by day five. By contrast, *Cdx1* transcripts were already detectable 24 hours post-treatment with a subsequent decline in expression from day two onward. These complementary kinetics of expression are consistent with retinoid-induction of COUP-TFI leading to down-regulation of *Cdx1* in spite of the continued presence of RA.

To further investigate the relationship between COUP-TF and *Cdx1*, we transfected P19 cells with an expression vector encoding either COUP-TFI or COUP-TFI $\Delta$ DBD together with a GFP expression plasmid. Cultures were then treated for 24 hours with RA or vehicle, and GFP-positive cells isolated by FACS.



**Figure 3-4:** Relationship between RA, *COUP-TFI* and *Cdx1* expression. A) P19 cells were cultured in the continuous presence of RA (1 $\mu$ M) for the indicated number of days; 0 corresponds to DMSO treatment. RNA was extracted and expression of *Cdx1* and *COUP-TFI* assessed by Northern blot analysis.  $\beta$ -actin was used as a loading control. B) P19 cells were transfected with a GFP expression vector and empty (p513) (lanes 1 and 2), *COUP-TFI* (lane 3) or *COUP-TFI* $\Delta$ DBD (lane 4) expression vectors. Cultures were treated with vehicle (lane 1) or 1  $\mu$ M RA (lanes 2-4) for 24 hours, GFP positive cells isolated by FACS and *Cdx1* expression assessed by Northern blot analysis, using  $\beta$ -actin as a loading control.

Nuclear proteins were extracted and equivalent expression of each COUP-TF was confirmed by western blot analysis (data not shown). Northern blot analysis revealed that COUP-TFI repressed induction of *Cdx1* by RA, whereas COUP-TFI $\Delta$ DBD had no detectable effect (Fig. 3-4B).

Together these results presented in this study are in agreement with a model whereby RA-mediated accumulation of COUP-TFI inhibits the acute RA-induction of *Cdx1*. Such a model may contribute to the complementary pattern of expression of these genes that are seen in the developing embryo, and offers a mechanistic basis for the lack of *Cdx1* expression in regions of the embryo, such as the trunk at E8.5, that are enriched for RA.

### Discussion

The results presented in this study provide evidence that COUP-TFs can effectively antagonize the induction of *Cdx1* by RA. The inability of the COUP-TFIΔDBD mutant to repress this induction indicates that COUP-TF DNA binding is essential to this outcome. This observation also rules out the possibility that this inhibition results from the interaction between the ligand binding domains of COUP-TFs and RAR, as such a mechanism does not require COUP-TF binding to DNA (17). Moreover, others have shown that COUP-TFs can interact with SMRT, N-CoR and HDAC1 (24,25). However, trichostatin A did not abrogate the effects of COUP-TF on the *Cdx1* promoter (data not shown) suggesting either that HDAC activity is not implicated in this event or that TSA-insensitive HDACs are involved (26,27).

Further evidence for competition for RARE binding comes from the finding that COUP-TFI and COUP-TFIΔDBD heterodimerized, and that COUP-TFIΔDBD reversed the inhibitory effects of COUP-TF1 on the *Cdx1* promoter. In this regard, the *Cdx1* RARE is closely related to a palindromic thyroid hormone receptor response element, and COUP-TF homodimers have been demonstrated to bind efficiently to such motifs (14,18,28). Taken together, these data support a model whereby COUP-TFs attenuate *Cdx1* expression in the presence of RA by competition with RXR-RAR heterodimers for binding to the *Cdx1* RARE.

In addition to the primitive streak and tail bud, *Cdx1* is also expressed in the endoderm of the developing intestine starting at E14 and eventually forming a rostral-caudal gradient, with higher levels in the colon (29). In this regard, the *Cdx1* RARE was first identified as a silencer element in a human colon carcinoma cell line (30). Moreover, several studies have also reported the presence of COUP-TFI and COUP-TFII transcripts along the developing gut endoderm and in the adult intestine (31-33). Taken together with our present findings, it is interesting to speculate that negative regulation by COUP-TFs may also contribute to the graded expression of *Cdx1* in the intestinal tract. Although the role of *Cdx1* in this tissue is presently unknown, it has been suggested that it may

be involved in specifying identity along the anterior-posterior axis of the gut (34) as has been demonstrated for *Cdx2* (2,35). A similar function may be masked in *Cdx1* null mutants by functional redundancy with *Cdx2* (3).

COUP-TFs are involved in numerous developmental processes (36,37). Of particular relevance is a potential role for COUP-TFI in vertebral patterning, as suggested by the high incidence of fusions between the exoccipital and basioccipital bones in the cognate null mutant. Based on our present findings, it is conceivable that this phenotype could be due to de-repression of *Cdx1*. The extensive homology between COUP-TF1 and COUP-TFII, together with their overlapping expression profiles, also suggests redundancy between these transcription factors, as has also been indicated from gene targeting studies. Such redundancy could account for the relatively weak vertebral phenotype observed in COUP-TFI null mice, relative to the anticipated effect of mis-expression of *Cdx1*.

The impact of RA on vertebral patterning has been well documented. Although many *Hox* genes respond to RA, only a limited number have been demonstrated to be direct targets. We have previously suggested that *Cdx1* serves as an intermediate between RA and mesodermal *Hox* gene expression (6). Thus, an understanding of means by which *Cdx1* expression is controlled is essential to resolving the mechanisms impacting on vertebral patterning. The results presented in the present study led us to propose the following model: *Cdx1* expression is induced by RA generated in the primitive streak region at E7.5. At E8.5, when RA production ceases in the tail bud *Cdx1* expression is maintained in the caudal embryo by Wnt signaling and an autoregulatory loop (9). To attenuate ectopic expression of *Cdx1* in the trunk, which is retinoid-positive, RA induces COUP-TF expression which blocks access to the RARE by competition with RXR-RAR heterodimers. This results in a restriction of *Cdx1* transcripts to the caudal embryo, contributing to appropriate *Hox* gene expression and patterning of the vertebral anterior-posterior axis.



## References

1. Subramanian, V., Meyer, B. I., and Gruss, P. (1995) *Cell* **83**, 641-653
2. Chawengsaksophak, K., James, R., Hammond, V. E., Kontgen, F., and Beck, F. (1997) *Nature* **386**, 84-87
3. van Den, A. E., Forlani, S., Chawengsaksophak, K., de Graaff, W., Beck, F., Meyer, B. I., and Deschamps, J. (2002) *Development* **129**, 2181-2193
4. Charite, J., de Graaff, W., Consten, D., Reijnen, M. J., Korving, J., and Deschamps, J. (1998) *Development* **125**, 4349-4358
5. Meyer, B. I. and Gruss, P. (1993) *Development* **117**, 191-203
6. Houle, M., Prinos, P., Iulianella, A., Bouchard, N., and Lohnes, D. (2000) *Mol.Cell Biol.* **20**, 6579-6586
7. Houle, M., Sylvestre, J. R., and Lohnes, D. (2003) *Development* **130**, 6555-6567
8. Prinos, P., Joseph, S., Oh, K., Meyer, B. I., Gruss, P., and Lohnes, D. (2001) *Dev.Biol.* **239**, 257-269
9. Beland, M., Pilon, N., Houle, M., Oh, K., Sylvestre, J. R., Prinos, P., and Lohnes, D. (2004) *Mol.Cell Biol.* **24**, 5028-5038
10. Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M. and Giguere, V. (1991) *Genes Dev.* **5**, 1333-1344.
11. Wang, L. H., Tsai, S. Y., Cook, R. G., Beattie, W. G., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1989) *Nature* **340**, 163-166
12. Jonk, L. J., de Jonge, M. E., Pals, C. E., Wissink, S., Vervaart, J. M., Schoorlemmer, J., and Kruijer, W. (1994) *Mech.Dev.* **47**, 81-97
13. Qiu, Y., Cooney, A. J., Kuratani, S., DeMayo, F. J., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 4451-4455
14. Cooney, A. J., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1992) *Mol.Cell Biol.* **12**, 4153-4163
15. Cooney, A. J., Leng, X., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1993) *J.Biol.Chem.* **268**, 4152-4160
16. Klierwer, S. A., Umesono, K., Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., and Evans, R. M. (1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 1448-1452

17. Leng, X., Cooney, A. J., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1996) *Mol.Cell Biol.* **16**, 2332-2340
18. Tran, P., Zhang, X. K., Salbert, G., Hermann, T., Lehmann, J. M., and Pfahl, M. (1992) *Mol.Cell Biol.* **12**, 4666-4676
19. Tsai, S. Y. and Tsai, M. J. (1997) *Endocr.Rev.* **18**, 229-240
20. Wilkinson, D. G. In situ hybridization. A practical approach. 1992. New York, N.Y., IRL Press.
21. Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W., and Chambon, P. (1988) *EMBO J.* **7**, 3037-3044
22. Brubaker, K., McMillan, M., Neuman, T., and Nornes, H. O. (1996) *Brain Res.Dev.Brain Res.* **93**, 198-202
23. Jonk, L. J., de Jonge, M. E., Vervaart, J. M., Wissink, S., and Kruijer, W. (1994) *Dev.Biol.* **161**, 604-614
24. Shibata, H., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1997) *Mol.Endocrinol.* **11**, 714-724
25. Smirnov, D. A., Hou, S., and Ricciardi, R. P. (2000) *Virology* **268**, 319-328
26. Gray, S. G. and Ekstrom, T. J. (2001) *Exp.Cell Res.* **262**, 75-83
27. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000) *Nature* **403**, 795-800
28. Berrodin, T. J., Marks, M. S., Ozato, K., Linney, E., and Lazar, M. A. (1992) *Mol.Endocrinol.* **6**, 1468-1478
29. Duprey, P., Chowdhury, K., Dressler, G. R., Balling, R., Simon, D., Guenet, J. L., and Gruss, P. (1988) *Genes & Development* **2**, 1647-1654
30. Hu, Y., Kazenwadel, J., and James, R. (1993) *Journal of Biological Chemistry* **268**, 27214-27225
31. Mietus-Snyder, M., Sladek, F. M., Ginsburg, G. S., Kuo, C. F., Ladas, J. A., Darnell, J. E., Jr., and Karathanasis, S. K. (1992) *Mol.Cell Biol.* **12**, 1708-1718
32. Pereira, F. A., Qiu, Y., Tsai, M. J., and Tsai, S. Y. (1995) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **53**, 503-508
33. Zhang, P., Bennoun, M., Gogard, C., Bossard, P., Leclerc, I., Kahn, A., and Vasseur-Cognet, M. (2002) *Mech.Dev.* **119**, 109-114

34. Lickert, H., Domon, C., Huls, G., Wehrle, C., Duluc, I., Clevers, H., Meyer, B.I., Freund, J.N., and Kemler, R. (2000) *Development* **127**, 3805-3813
35. Beck, F., Chawengsaksophak, K., Waring, P., Playford, R. J., and Furness, J. B. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 7318-7323
36. Qiu, Y., Pereira, F. A., DeMayo, F. J., Lydon, J. P., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1997) *Genes Dev.* **11**, 1925-1937
37. Pereira, F. A., Qiu, Y., Zhou, G., Tsai, M. J., and Tsai, S. Y. (1999) *Genes Dev.* **13**, 1037-1049

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Dr. Dr.Ming-Jer Tsai for the COUP-TF cDNAs and Nathalie Bouchard and Karen Oh for excellent technical assistance. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research.

## **CHAPITRE 4**

## **DISCUSSION**

## 4.1 Le maintien de l'expression de *Cdx1*

### 4.1.1 Le rôle des ligands Wnt

La famille des ligands Wnt contrôle divers processus au cours du développement (Wodarz and Nusse, 1998). Chez les vertébrés, elle est composée de près d'une vingtaine de membres. L'implication de ces ligands dans le développement vertébral a été démontrée suite à l'observation de transformations homéotiques vertébrales, associées à une altération de l'expression de certains gènes *Hox*, chez les souris *Wnt3a*<sup>-/-</sup> ainsi que chez les mutants *vt/vt* (Greco et al., 1996; Ikeya and Takada, 2001; Takada et al., 1994).

L'expression de *Cdx1* n'étant plus sous le contrôle de l'AR à partir du jour E8.5, une recherche intensive des facteurs qui contribuent à son maintien a été entreprise. Subséquemment, des études ont permis d'établir que l'expression de *Cdx1* est directement régulée par la voie Wnt3a, via deux éléments de réponses LRE présents dans la partie proximale du promoteur (Lickert et al., 2000; Prinos et al., 2001). Récemment, certaines évidences ont permis d'envisager la possibilité que Wnt3a soit également impliqué dans l'initiation de l'expression de *Cdx1*. Notamment, l'activité d'un transgène *lacZ* dont l'expression est contrôlée par le promoteur de *Cdx1* où les LRE ont été mutés, est indécélable entre E7.5 et E8.5 (Lickert and Kemler, 2002). De plus, l'inactivation fonctionnelle des LRE *in vivo* retarde l'initiation de l'expression endogène de *Cdx1*, en plus d'affecter sévèrement les niveaux d'expression à tous les stades observés (Pilon et al., 2004b). Une autre observation permettant de renforcer cette hypothèse provient de l'analyse du phénotype des mutants LRE, qui manifestent la présence de transformations homéotiques affectant les vertèbres C1 à C7. Alternativement, la mutation des LRE pourrait prévenir la liaison des effecteurs nucléaires d'autres ligands Wnt, qui seraient impliqués dans l'induction de l'expression de *Cdx1*. Par la même occasion, cette possibilité pourrait expliquer le fait que les transformations présentes chez les mutants LRE soient plus sévères et plus pénétrantes que celles observées chez les mutants *Wnt3a*<sup>-/-</sup>, qui survivent à la naissance (Ikeya and Takada, 2001). À ce sujet, il est intéressant de noter que les

embryons *Lefl*<sup>-/-</sup> *Tcf1*<sup>-/-</sup> présentent une morphologie anormale des somites localisés dans la partie rostrale de l'axe, par rapport aux membres antérieurs (Galceran et al., 1999). Malheureusement, ces embryons ne survivent pas à la naissance et ne parviennent que très rarement à dépasser le stade du jour E10.5. Dans l'éventualité où d'autres ligands Wnt contrôleraient l'expression de *Cdx1*, on peut envisager la possibilité que les anomalies détectées dans la morphologie des somites antérieurs chez les mutants *Lefl*<sup>-/-</sup> *Tcf1*<sup>-/-</sup>, se traduisent par un phénotype vertébral plus sévère que celui manifesté par les mutants *Wnt3a*<sup>-/-</sup> mais identique à celui décrit pour les mutants LRE. Enfin, l'analyse des mutants générés par l'inactivation conditionnelle des allèles *Lef1* et *Tcf1* permettra de vérifier cette hypothèse.

Plusieurs ligands Wnt sont susceptibles de pouvoir réguler l'expression de *Cdx1* dans le mésoderme présomitique. À cet effet, *Wnt3*, *Wnt5a*, *Wnt5b* et *Wnt8* sont tous exprimés au niveau de la ligne primitive et du bourgeon de la queue de l'embryon (Bouillet et al., 1996; Liu et al., 1999; Takada et al., 1994), qui génèrent les précurseurs du mésoderme. Le rôle de *Wnt3* dans le développement vertébral est difficile à évaluer puisque son inactivation prévient la formation de la ligne primitive et du mésoderme (Liu et al., 1999). Par ailleurs, les mutants *Wnt5a*<sup>-/-</sup> présentent plusieurs anomalies du squelette axial (Yamaguchi et al., 1999). Cependant l'étude de ces mutants suggère que la fonction de *Wnt5a* consiste à contrôler le processus de prolifération des progéniteurs du mésoderme paraxial. Aussi, *Wnt5a* ne semble pas influencer la stabilité de  $\beta$ -catenin, mais active plutôt la voie du phosphatidylinositol (Slusarski et al., 1997). Ces données suggèrent donc que les LRE soient dispensables à la transmission du signal *Wnt5a* et permettent d'expliquer l'absence d'induction de l'expression de *Cdx1* dans des cellules souches embryonnaires stimulées avec le ligand *Wnt5a* (Lickert et al., 2000). Le rôle des autres ligands *Wnt* n'ayant pas été examiné, il est présentement difficile de spéculer sur leur fonction dans le contrôle de l'expression de *Cdx1*.

#### 4.1.2 L'autorégulation

L'expression de *Cdx1* est sévèrement compromise chez les mutants *Cdx1*<sup>-/-</sup> au jour E8.5, indiquant que Cdx1 est essentiel au maintien de sa propre expression (Prinos et al., 2001). Nous avons en effet démontré que Cdx1 s'autorégule en s'associant directement avec LEF1 (Beland et al., 2004). Ce mécanisme est indépendant de la liaison de Cdx1 à l'ADN mais requiert celle de LEF1 aux LRE. Il est intéressant de noter que la diminution de l'expression de *Cdx1* au jour E8.5 chez les mutants LRE (Pilon et al., 2004b) est beaucoup plus grande que celle observée chez les mutants *Wnt3a*<sup>-/-</sup> (Ikeya and Takada, 2001). Alors que nous ne pouvons exclure la possibilité que l'inactivation des LRE prévienne la transduction du signal par d'autres ligands Wnt, une autre explication s'impose. Au jour E8.5, la voie Wnt ainsi que le complexe d'autorégulation LEF1-Cdx1 contribuent à l'expression de *Cdx1* via la liaison aux LRE. Par conséquent, l'inactivation des LRE inhibe l'activité de deux voies importantes pour le maintien de l'expression de *Cdx1*.

Récemment, certaines évidences suggèrent que les membres de la famille Cdx soient capables de s'inter-réguler. Par exemple, la surexpression de *Cdx2* réprime l'expression endogène de *Cdx1*, dans une lignée cellulaire intestinale (Lorentz et al., 1997). *Cdx2* inhibe aussi l'activité du promoteur de *Cdx1*, induite par la coexpression de *β-catenin* et *Tcf4* (Domon-Dell and Freund, 2002). Par contre, le mécanisme responsable de cet effet n'a pas été caractérisé, et pourrait être indirect. D'autre part, des données préliminaires suggèrent que les complexes LEF1-Cdx1 puissent contrôler l'expression de *Cdx4*. L'expression des transcrits *Cdx4* est induite par la voie Wnt3a *in vivo*, et diminué chez les mutants *vt/vt* au jour E9.5 (Pilon et al., 2004a). Les éléments responsables de cet effet ont été identifiés (LRE1, LRE2 et LRE3) et leur caractérisation a permis de démontrer que LEF1 s'associe directement avec deux d'entre-eux (LRE2 et LRE3) pour activer la transcription. De manière intéressante, la coexpression de LEF1, *β-catenin* et Cdx1 entraîne une synergie dans l'activation d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de *Cdx4*. Ces données sont similaires à celles rapportées pour le promoteur de *Cdx1* (Beland et al., 2004), et suggèrent que Cdx1 puissent



réguler l'expression de *Cdx4* via son association avec LEF1. Le mécanisme à l'origine de cette synergie n'a toutefois pas encore été étudié. Contrairement au promoteur de *Cdx1*, l'analyse des séquences régulatrices de *Cdx4* a mené à l'identification de motifs potentiellement impliqués dans la liaison aux facteurs Cdx. Étant donné que ces éléments sont localisés entre les sites LRE2 et LRE3, reconnus par LEF1, il est possible que la liaison de Cdx1 au promoteur soit requise dans ce cas-ci. Enfin, des études supplémentaires devront être entreprises afin d'établir l'existence de ce mécanisme *in vivo*. Par exemple, l'analyse de l'expression de *Cdx4* chez les mutants *Cdx1* et *vt/vt / Cdx1<sup>+/-</sup>* devrait permettre la vérification de l'impact du complexe LEF1-Cdx1 sur l'expression de *Cdx4*.

## 4.2 Le rôle des FGF

L'ensemble des données rapportées à ce jour révèle que les facteurs de transcription de la famille Cdx exercent la fonction d'intermédiaire dans la transduction des signaux de l'AR et de la voie Wnt, sur le promoteur des gènes *Hox*. D'autre part, plusieurs évidences suggèrent leur implication dans la transduction du signal par les peptides extracellulaires FGF (Fibroblast Growth Factor) dont la liaison à leurs récepteurs transmembranaires de type « tyrosine kinase » active plusieurs voies, incluant celle des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Powers et al., 2000).

### 4.2.1 La régulation de l'expression de *Xcad3* chez *Xenopus*

Chez *Xenopus*, eFGF est exprimé dans le mésoderme postérieur de l'embryon, et sa surexpression inhibe le développement de structures antérieures (Isaacs et al., 1994; Isaacs et al., 1995). La caractérisation du mécanisme moléculaire responsable de cet effet a ensuite permis d'établir que la surexpression de eFGF entraîne une antériorisation de la limite d'expression de *Xcad3* (l'homologue de *Cdx4*) ainsi que celle de certains gènes *Hox*, dont *Hoxa7* (Pownall et al., 1996). D'ailleurs, la surexpression de *Xcad3* et de *Hoxa7* résulte aussi en une troncation des structures antérieures, confirmant ainsi que le phénotype associé à la surexpression de eFGF est causé par une expansion du domaine d'expression de

ces gènes. Il a aussi été démontré que l'inhibition de la voie FGF via l'expression d'un dominant négatif *FGFR* (FGF Receptor) diminue celle de *Xcad3* et *Hoxa7* (Isaacs et al., 1994; Northrop and Kimelman, 1994). De plus, l'injection d'un ARNm encodant *Xcad3* permet de rétablir les niveaux d'expression de *Hoxa7*, dans des conditions où la voie FGF est inactivée (Pownall et al., 1996). À l'opposé l'injection d'un dominant négatif *Xcad3* empêche l'induction de l'expression de *Hoxa7* par eFGF (Isaacs et al., 1998). Par conséquent, il apparaît évident que la fonction exercée par *Xcad3* se situe en aval de la voie FGF et en amont des gènes *Hox*. Ces données sont aussi en accord avec celles d'une autre étude qui révèle que *Cdx1* transactive le promoteur murin de *Hoxa7* *in vitro* (Subramanian et al., 1995).

#### 4.2.2 La régulation de *CdxA* et *CdxB* chez le poulet

Les résultats d'une étude récente, utilisant le poulet comme modèle, suggèrent que la voie FGF contrôle l'expression de *CdxA* et *CdxB* (les homologues de *Cdx1* et *Cdx4*) dans le neurectoderme (Bel-Vialar et al., 2002). En effet la culture d'embryons en présence de FGF2 entraîne une antériorisation de la limite d'expression de *CdxA* et *CdxB* dans le tube neural. Parallèlement, une expansion antérieure du domaine d'expression de *Hoxb9* est aussi observée. De plus l'électroporation unilatérale d'un dominant négatif *Xcad3* dans le tube neural d'embryons cultivés en présence de FGF2 réduit l'induction de *Hoxb9*. Ainsi l'ensemble de ces observations suggère que la voie FGF régule l'expression des facteurs *Cdx* et que, par conséquent, l'expression ectopique de *Hoxb9* induite par FGF2 dans le tube neural dépende de l'action de ces facteurs.

#### 4.2.3 Le cas des gènes *Cdx* chez la souris

Si les études effectuées chez *Xenopus* et le poulet ont permis de générer des évidences persuasives en faveur de la régulation des membres de la famille *Cdx* par la voie FGF, il ne semble pas en être de même chez la souris. Les mutants hypomorphes *FGFR1* manifestent la présence de transformations homéotiques vertébrales antérieures, associées à une altération du profil d'expression de

certaines gènes *Hox* dans le mésoderme (Partanen et al., 1998). Malgré le fait que ces résultats démontrent l'implication de la voie FGF dans l'établissement de l'identité axiale, celle-ci semble indépendante de l'activité des facteurs de transcription Cdx. En effet, il a été démontré que l'expression de *Cdx1* et de *Cdx4* n'est pas affectée chez ces mutants. Par contre, il est à noter qu'une diminution du niveau d'expression des transcrits *FGF8* est observée dans le mésoderme d'embryons chez qui les LRE du promoteur de *Cdx1* ont été inactivés (Pilon et al., 2004b). Cette observation soulève donc la possibilité que, chez la souris, les facteurs Cdx puissent agir en amont de la voie FGF. D'ailleurs, le fait que l'expression de *FGF8* soit également diminuée chez les mutants *vt/vt* (Aulehla et al., 2003) supporte cette hypothèse, *Cdx1* et *Cdx4* étant des cibles directes de la voie Wnt3a (Pilon et al., 2004a; Prinos et al., 2001).

#### 4.3 La prévention de l'expression ectopique de *Cdx1*

Les domaines d'expression de *Cdx1* sont très dynamiques et régressent postérieurement durant l'élongation caudale de l'embryon. Les premiers transcrits sont détectés dans la région de la ligne primitive au jour E7.5, et s'accumulent ensuite postérieurement de sorte qu'à partir du jour E8, leur expression est limitée à la partie caudale de l'embryon (Meyer and Gruss, 1993). L'étude des mécanismes moléculaires responsables du profil restreint de *Cdx1* n'avait pas, jusqu'à ce jour, été abordée. Les résultats présentés dans le chapitre 3 révèlent l'existence d'un rôle pour les membres de la famille COUP-TF dans ce processus.

La régression postérieure des transcrits *Cdx1* débute au moment de l'induction de l'expression de COUP-TFI/II, dans la partie antérieure de l'embryon, et se poursuit tout au long de l'expansion caudale de leurs transcrits. L'élaboration d'un modèle permettant d'établir un lien entre la fonction de COUP-TFI/II et la distribution des transcrits *Cdx1* a été facilité par plusieurs observations. D'abord, l'expression de *Cdx1* est induite par l'AR via la liaison de l'hétérodimère RXR-RAR à l'élément RARE, présent dans le promoteur de *Cdx1* (Houle et al., 2000; Houle et al., 2003). Bien que l'AR soit absent de la région caudale à partir du jour E8.5, sa présence est détectée dans la partie rostrale de

l'embryon (Rossant et al., 1991). Enfin la prévention de l'expression ectopique de *Cdx1* dans ces domaines par les membres de la famille COUP-TF est renforcée par la capacité de ces derniers à interférer avec la voie de signalisation de l'AR (Tsai and Tsai, 1997). D'ailleurs, nos résultats démontrent que COUP-TFI et II inhibent l'induction de l'expression de *Cdx1* par l'AR, via la liaison au motif RARE.

L'induction de l'expression des facteurs COUP-TFI/II par l'AR est en accord avec le modèle suggéré. Dans un contexte où l'expression de certains gènes, requis pour le développement rostral de l'embryon, dépend de l'AR, l'accumulation des transcrits COUP-TFI/II est essentielle pour prévenir l'induction d'autres gènes capables de répondre à l'AR, mais dont l'expression ectopique pourrait engendrer des malformations. À cet effet, il a été démontré qu'une expansion antérieure des domaines d'expression de *Cdx1*, chez des souris transgéniques exprimant *Cdx1* sous le contrôle du promoteur de *RARβ2*, entraîne l'apparition de plusieurs anomalies (Charite et al., 1998). Par exemple, les somites présentent une forme ainsi qu'une taille irrégulière et plusieurs d'entre-eux sont fusionnés. Dans certains cas, on observe également l'absence de fermeture du tube neural.

L'étude de la fonction des membres de la famille COUP-TF a été analysée *in vivo* par l'inactivation des gènes correspondants. Les mutants COUP-TFI présentent une altération dans la morphogenèse des nerfs crâniens et dans la projection des axones de diverses régions (Qiu et al., 1997). Les fonctions sensorielles et motrices de ces souris sont profondément endommagées et entraînent la mort à la naissance. D'autre part, la mutation qui affecte l'expression de COUP-TFII cause des troubles de l'angiogénèse et du développement cardiaque (Pereira et al., 1999). La majorité de ces embryons ne survivent pas jusqu'au jour E10. Ces données indiquent que COUP-TFI et II exercent des fonctions uniques durant le développement embryonnaire. Toutefois, ceux-ci partagent une grande homologie de séquence et leurs profils d'expression se chevauchent dans plusieurs domaines. Il est donc possible que certaines de leurs fonctions soient redondantes. Malgré le fait que 98% des mutants COUP-TFI

manifestent une fusion entre l'os basioccipital et exoccipital (Qiu et al., 1997), ce phénotype est moins sévère que celui anticipé par la fonction de répression de COUP-TFI sur l'expression de *Cdx1*. Cependant, le rôle de COUP-TFI dans le développement vertébral pourrait être masqué par la présence de COUP-TFII, aussi capable de prévenir l'induction de l'expression de *Cdx1* par l'AR (Chapitre 3). De toute évidence, d'autres études sont nécessaires afin de confirmer la fonction de répression de COUP-TFI/II *in vivo*. Il serait intéressant par exemple, d'observer la distribution des transcrits *Cdx1* chez les double-mutants COUP-TFI/II. Enfin, la génération de souris transgéniques, exprimant COUP-TFI ou II dans la partie caudale de l'embryon, permettrait également de vérifier l'effet de ces facteurs sur l'expression endogène de *Cdx1*.

#### 4.4 Le modèle de régulation de l'expression *Cdx1*

Nos connaissances actuelles des mécanismes qui contribuent à la régulation transcriptionnelle du gène *Cdx1* sont résumées dans le modèle présenté à la figure 4.1. L'AR exerce un rôle primordial durant la phase initiale (E7.5) d'activation de la transcription, dans la région de la ligne primitive (Houle et al., 2000; Houle et al., 2003; Lickert and Kemler, 2002). Les effets engendrés par l'inactivation des LRE *in vivo* permettent aussi d'envisager la possibilité que les ligands de la famille Wnt soient aussi impliqués durant cette phase (Lickert and Kemler, 2002; Pilon et al., 2004b). Éventuellement, les transcrits *Cdx1* s'accumulent postérieurement, et leur expression devient indépendante de l'AR. La prévention de l'expression ectopique de *Cdx1* dans la partie rostrale de l'embryon, riche en AR, est prévenue par l'effet répresseur des facteurs de transcription de la famille COUP-TF, dont l'expression est induite par l'AR (Chapitre 3). À partir du jour E8.5, l'expression de *Cdx1* est maintenue par une boucle d'autorégulation ainsi que par les effecteurs nucléaires de la voie Wnt3a (Beland et al., 2004; Prinos et al., 2001).

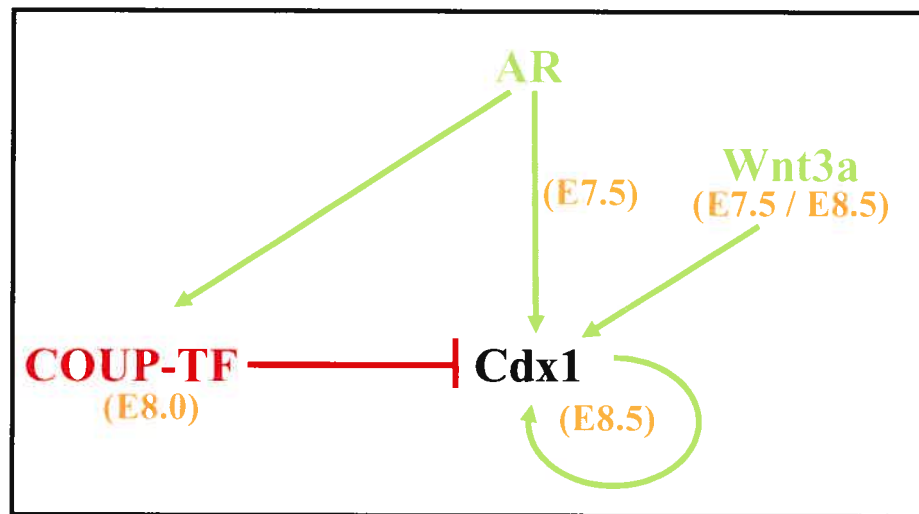


Figure 4-1: Modèle de la régulation transcriptionnelle du gène *Cdx1*.

## 4.5 Perspectives

### 4.5.1 Les interactions HMG-Cdx1

Le domaine HMG correspond à une séquence de 79 acides aminés impliquée dans la liaison à l'ADN (Pevny and Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999). Contrairement à la majorité des domaines de liaison à l'ADN, le domaine HMG interagit avec le sillon mineur de la double hélice d'ADN. Ceci a pour effet d'induire un changement local dans la structure de l'ADN. Il existe deux familles de protéines à domaine HMG (Grosschedl et al., 1994). La première est constituée des membres HMG1, HMG2 et UBF. Ceux-ci possèdent plusieurs domaines HMG, lient l'ADN de manière peu spécifique et sont exprimés ubiquitairement durant l'embryogenèse. La deuxième famille inclut les facteurs SOX et LEF / TCF. Ils possèdent un seul domaine HMG, reconnaissent une séquence consensus d'ADN et leur expression est particulièrement restreinte durant le développement.

#### 4.5.1.1 Les facteurs LEF / TCF et l'autorégulation de Cdx1

Les résultats présentés dans le chapitre 2 révèlent que Cdx1 s'autorégule en s'associant avec LEF1 (Beland et al., 2004). L'interaction est directe et implique l'homéodomaine de Cdx1 et la boîte B de LEF1. Plusieurs observations suggèrent que Cdx1 puissent aussi s'autoréguler en s'associant avec les autres membres de la famille LEF / TCF.

Tel que mentionné dans le chapitre d'introduction, LEF1 et TCF1 exercent une fonction redondante dans la voie de signalisation Wnt (Galceran et al., 1999). Il apparaît donc possible que TCF1 puisse également être impliqué dans le mécanisme d'autorégulation de Cdx1. D'ailleurs, le domaine HMG de TCF1 est presque identique (95% d'homologie au niveau de la séquence en acides aminés) à celui de LEF1. Cependant la séquence de leur boîte B diffère de deux acides aminés (LEF1: KKKKRKREK, TCF1: KKKRRSREK). D'autres analyses seront utiles afin de déterminer l'impact de cette différence sur la capacité d'interaction de TCF1 avec Cdx1.

Les résultats d'une étude démontrent que l'expression de *Cdx1* dans l'endoderme viscéral est aussi régulée par la voie Wnt (Lickert et al., 2000). Dans ce tissu, le profil d'expression de *Tcf3* et *Tcf4* chevauche celui de *Cdx1* (James and Kazenwadel, 1991; Korinek et al., 1998b). Les mutants *Tcf4*<sup>-/-</sup> présentent un phénotype intestinal associé à un défaut de prolifération des cellules qui composent normalement les cryptes du petit intestin (Korinek et al., 1998a). L'analyse de la distribution des transcrits *Cdx1* chez ces mutants suggère que TCF4 régule l'expression de *Cdx1* dans cette région (Lickert et al., 2000). Étant donnée que la distribution des transcrits *Cdx1* n'est pas affectée dans l'épithélium du colon de ces mutants, les auteurs ont proposé un modèle selon lequel TCF4 contrôle l'expression de *Cdx1* dans les cellules des cryptes du petit intestin alors que TCF3 serait responsable de son expression dans le colon. Malgré le fait qu'aucune preuve démontrant l'existence du mécanisme d'autorégulation de Cdx1 dans l'endoderme viscéral n'ait été apportée, l'ensemble des observations présentées dans cette section permet d'envisager la possibilité d'une interaction

fonctionnelle entre Cdx1 et la boîte B de TCF3 (KKKKRKREK) et/ou celle de TCF4 (KKKKRKRDK).

#### 4.5.1.2 Le rôle de l'interaction SOX2-Cdx1

Jusqu'à présent, plus d'une vingtaine de gènes *Sox* ont été identifiés. Sur la base de l'homologie qui caractérise leur domaine HMG, ils ont été subdivisés en sept groupes (A-G). SOX2 appartient au sous-groupe B1, aussi composé de SOX1 et SOX3. Les résultats présentés dans le chapitre 2 démontrent l'existence d'une interaction directe entre l'homéodomaine de Cdx1 et SOX2 (Beland et al., 2004). Bien que le rôle de cette interaction soit inconnu, plusieurs évidences suggèrent que celle-ci soit fonctionnelle. D'abord, la régulation transcriptionnelle par les membres de la famille SOX requiert la présence d'un cofacteur spécifique, qui lie une séquence voisine à celle de SOX dans le promoteur des gènes cibles (Kamachi et al., 2000; Pevny and Lovell-Badge, 1997; Wegner, 1999). De manière intéressante, SOX2 et Oct-3/4 (qui possède un domaine bipartite de liaison à l'ADN, incluant un homéodomaine) sont tous deux requis pour l'expression d'un gène rapporteur dont les séquences régulatrices contrôlent l'expression de *Fgf4* dans les cellules de carcinomes embryonnaires (Ambrosetti et al., 1997; Yuan et al., 1995). Dans ce contexte, les deux facteurs lient l'ADN sur des sites adjacents et interagissent directement via leur domaine de liaison à l'ADN.

*Sox2* est exprimé dans les cellules du neurectoderme (Wood and Episkopou, 1999), où sa fonction est essentielle à la différenciation neuronale des cellules de l'ectoderme (Kishi et al., 2000). Même si les gènes cibles de SOX2 dans ce tissu sont encore inconnus, le fait que *Cdx1* y soit aussi exprimé (Meyer and Gruss, 1993) permet d'envisager la possibilité d'une coopération entre les deux protéines. La redondance fonctionnelle qui caractérise les membres de la famille Cdx (van Den et al., 2002) ne permet probablement pas d'évaluer leur contribution réelle au développement du système nerveux central.



#### 4.5.2 Les interactions Hox-Cdx

Il est maintenant généralement admis que les gènes *Hox* sont les principaux médiateurs de la spécification de l'identité axiale. Par ailleurs, la contribution des membres de la famille Cdx à ce processus est essentielle, si on considère l'étendue du phénotype vertébral manifestée par les mutants *Cdx1*, *Cdx2* et les double-mutants correspondants (van Den et al., 2002). Les études qui révèlent que les facteurs Cdx influencent le développement vertébral via la régulation transcriptionnelle de l'expression de certains gènes *Hox* dans le mésoderme présomitique, sont abondantes. Mais s'agit-il de la seule voie empruntée par les membres de cette famille ? Nous avons envisagé la possibilité qu'il n'en soit pas ainsi en émettant l'hypothèse d'une coopération fonctionnelle entre les membres de ces deux familles. Les résultats de cette étude sont présentés en annexe.

Étant donné que les transcrits *Cdx1* et *Hoxd4* sont coexprimés dans le mésoderme présomitique (Gaunt et al., 1989; Meyer and Gruss, 1993), et que l'analyse des mutants *Cdx1*<sup>-/-</sup> et *Hoxd4*<sup>-/-</sup> indique qu'ils sont tous deux impliqués dans la spécification de l'identité de la deuxième vertèbre cervicale (Horan et al., 1995a; Subramanian et al., 1995), nous avons cherché à savoir s'ils pouvaient interagir physiquement. Les résultats obtenus démontrent en effet, l'existence d'une association directe entre les deux facteurs (figure A-1). Cette interaction semble spécifique puisque Cdx1 et Hoxa9 ne forment pas de complexe, dans des conditions expérimentales de liaison identiques. De plus, la délétion progressive des séquences encodant chacune des protéines a permis de localiser les domaines impliqués dans l'interaction soient, l'homéodomaine de Cdx1 et la région C-terminale de Hoxd4 (comprenant aussi l'homéodomaine de la protéine). La démonstration d'une interaction entre les facteurs Cdx et Hox, dans un contexte cellulaire (via immunoprécipitation) n'a toutefois pu être réalisée. Une des possibilités pouvant expliquer ce phénomène implique l'existence d'un mécanisme de régulation de l'interaction, basé sur la modification post-traductionnelle des facteurs en cause. À cet effet, diverses études ont déjà rapporté que les modifications telles l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, la

sumoylation et la glycosylation, influencent la capacité d'interaction de plusieurs facteurs de transcription (Chauchereau et al., 2003; Firulli et al., 2003; Gewinner et al., 2004; Kwak et al., 2003; Polesskaya et al., 2001).

Il est noter qu'une interaction a également pu être observées entre Cdx2 et Hoxd4 (figure A-2). La comparaison des séquences en acides aminés de Cdx1 et Cdx2 révèle une grande homologie au niveau de l'homéodomaine (92%), alors que les séquences localisées à l'extérieur de cette région sont peu conservées. Ainsi, il est fort probable que l'homéodomaine de Cdx2 soit aussi impliqué dans l'interaction avec Hoxd4.

Enfin, l'impact de l'interaction Cdx1-Hoxd4 sur le développement vertébral a été analysé *in vivo* par l'étude du phénotype associé à l'inactivation des gènes correspondants, seule ou en combinaison (figure A-3, tableA-1). Les résultats obtenus indiquent une augmentation de la sévérité ainsi que de la pénétrance du phénotype vertébral observé chez les double-mutants, par rapport aux simple-mutants correspondants. De manière intéressante, l'inactivation combinée des gènes *Cdx1* et *Hoxb4* se traduit également par un effet de synergie au niveau du phénotype vertébral. Les gènes *Hoxb4* et *Hoxd4* appartiennent au même groupe paralogue des complexes *Hox*. Ils possèdent une grande homologie de séquence, partagent la même limite d'expression antérieure et exercent des fonctions partiellement redondantes dans le développement (Horan et al., 1995b). Ainsi, il apparaît possible que le phénotype vertébral manifesté par les double-mutants *Hoxb4 / Cdx1* résulte d'une interaction directe entre les deux protéines.

L'effet de synergie engendré par l'inactivation combinée de *Cdx1* et *Hoxb4* (ou *Hoxd4*) est similaire à celui observé chez les double-mutants *vt/vt / Cdx1<sup>+/-</sup>* (Beland et al., 2004). Dans ce dernier cas, les évidences présentées suggèrent que la synergie témoigne de l'importance du rôle exercé par l'interaction LEF1-Cdx1 dans le développement vertébral, et permet d'éliminer la possibilité que les deux facteurs agissent via des mécanismes indépendants, qui se manifesterait alors par un effet additif. Par conséquent, l'ensemble de ces données suggère une interaction fonctionnelle entre Cdx1 et les membres du quatrième groupe paralogue des gènes *Hox*.

Les mécanismes impliqués dans l'activation de la transcription par les facteurs Cdx et Hox ne sont pas clairement définis. La majorité des membres de la famille Hox reconnaissent le motif TAAT comme élément de réponse (Gehring et al., 1994). Toutefois la formation d'hétérodimères avec les cofacteurs PBX et MEIS, permet d'augmenter l'affinité et la spécificité de la liaison à l'ADN des facteurs Hox (Mann and Affolter, 1998). Les résultats d'une étude révèlent que l'activité des complexes PBX-Hox dépend du ratio entre l'activité des corépresseurs associés à PBX et celle des coactivateurs associés à son partenaire Hox (Saleh et al., 2000). D'ailleurs CBP interagit avec le domaine amino-terminal de Hoxd4 et Hoxa7 et stimule leur activité transcriptionnelle (Chariot et al., 1999; Saleh et al., 2000). Malgré des efforts considérables, bien peu de gènes cibles de ces complexes ont été identifiés. Parmi les mieux caractérisés, on retrouve quelques gènes *Hox* capables de s'autoréguler ou étant régulés par les produits encodés par d'autres gènes *Hox* (Gould et al., 1997; Popperl and Featherstone, 1992; Popperl et al., 1995). Par ailleurs, le domaine de transactivation des membres de la famille Cdx a été localisé dans la partie amino-terminale de la protéine (Beland et al., 2004; Taylor et al., 1997). Les évidences ayant permis de caractériser les mécanismes de la régulation transcriptionnelle par les facteurs Cdx sont peu nombreuses. Les seules ayant été rapportées à ce jour stipulent que Cdx1 s'autorégule en s'associant avec LEF1, et que l'interaction de Cdx2 avec CBP augmente son activité transcriptionnelle (Beland et al., 2004; Lorentz et al., 1999).

Le fait que les facteurs Cdx soient impliqués dans le contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes *Hox* complique l'analyse des interactions décrites entre ces deux groupes de facteurs de transcription. En effet, l'inactivation de *Cdx1* entraîne une postériorisation de la limite d'expression antérieure de *Hoxd4* (van Den et al., 2002). Ainsi, une augmentation de la fréquence de la transformation C2 en C1 chez les double-mutants *Hoxd4*<sup>+/-</sup>*Cdx1*<sup>+/-</sup> par rapport aux mutants hétérozygotes *Hoxd4*<sup>+/-</sup> pourrait être interprétée par une diminution plus prononcée du niveau d'expression des transcrits *Hoxd4*. Cependant, l'apparition de nouvelles transformations chez les double-mutants,

affectant des vertèbres dont l'identité n'est pas altérée chez les souris homozygotes *Hoxd4*<sup>-/-</sup>, favorise l'hypothèse d'une association fonctionnelle entre les facteurs Hox et Cdx. De plus, l'étude des double-mutants *Hoxb4*<sup>-/-</sup>*Hoxd4*<sup>-/-</sup> a permis de démontrer, en plus de la redondance fonctionnelle entre les deux facteurs quant à l'établissement de l'identité de C2, que le nombre de vertèbres transformées excède celui prédit par le modèle de prévalence postérieure (Horan et al., 1995b). Ainsi, les vertèbres qui ne sont pas situées au niveau de la limite d'expression antérieure des gènes inactivés, sont aussi transformées. Ces résultats indiquent donc que l'activité *Hoxb4* et *Hoxd4* est requise dans un domaine plus large que celui défini par le phénotype des simple-mutants. Étant donné que *Hoxb4* et *Hoxd4* interagissent tous deux avec *Cdx1*, il est possible que l'absence des complexes *Hoxb4*-*Cdx1* et *Hoxd4*-*Cdx1* chez les double-mutants *Hoxb4*<sup>-/-</sup>*Hoxd4*<sup>-/-</sup> affecte l'expression de gènes qui exercent une fonction à plusieurs niveaux de l'axe. Enfin, la confirmation de l'existence de ces complexes *in vivo* nécessite l'identification des gènes cibles de ces interactions dans le mésoderme présomitique. Ceux-ci seront utiles à la caractérisation du mécanisme employé et permettront de mieux comprendre comment les interactions Hox-Cdx influencent le développement vertébral.

## RÉFÉRENCES

Aberle,H., Bauer,A., Stappert,J., Kispert,A., and Kemler,R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797-3804.

Abu-Abed,S., Dolle,P., Metzger,D., Beckett,B., Chambon,P., and Petkovich,M. (2001). The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* 15, 226-240.

Abu-Abed,S., Dolle,P., Metzger,D., Wood,C., MacLean,G., Chambon,P., and Petkovich,M. (2003). Developing with lethal RA levels: genetic ablation of Rarg can restore the viability of mice lacking Cyp26a1. *Development* 130, 1449-1459.

Abu-Abed,S.S., Beckett,B.R., Chiba,H., Chithalen,J.V., Jones,G., Metzger,D., Chambon,P., and Petkovich,M. (1998). Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. *J. Biol. Chem.* 273, 2409-2415.

Allan,D., Houle,M., Bouchard,N., Meyer,B.I., Gruss,P., and Lohnes,D. (2001). RAR gamma and Cdx1 interactions in vertebral patterning. *Developmental Biology* 240, 46-60.

Ambrosetti,D.C., Basilico,C., and Dailey,L. (1997). Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol. Cell Biol.* 17, 6321-6329.

Ang,H.L., Deltour,L., Hayamizu,T.F., Zgombic-Knight,M., and Duester,G. (1996a). Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J. Biol. Chem.* 271, 9526-9534.

Ang,H.L., Deltour,L., Zgombic-Knight,M., Wagner,M.A., and Duester,G. (1996b). Expression patterns of class I and class IV alcohol dehydrogenase genes in developing epithelia suggest a role for alcohol dehydrogenase in local retinoic acid synthesis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 20, 1050-1064.

Aulehla,A. and Herrmann,B.G. (2004). Segmentation in vertebrates: clock and gradient finally joined. *Genes Dev.* 18, 2060-2067.

Aulehla,A., Wehrle,C., Brand-Saberi,B., Kemler,R., Gossler,A., Kanzler,B., and Herrmann,B.G. (2003). Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev. Cell* 4, 395-406.

Axelrod,J.D., Miller,J.R., Shulman,J.M., Moon,R.T., and Perrimon,N. (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev.* 12, 2610-2622.

- Balkan,W., Colbert,M., Bock,C., and Linney,E. (1992). Transgenic indicator mice for studying activated retinoic acid receptors during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 3347-3351.
- Baniahmad,A., Kohne,A.C., and Renkawitz,R. (1992). A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *EMBO J.* 11, 1015-1023.
- Bannister,A.J. and Kouzarides,T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.
- Barker,N., Hurlstone,A., Musisi,H., Miles,A., Bienz,M., and Clevers,H. (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J.* 20, 4935-4943.
- Bastie,J.N., Despouy,G., Balitrand,N., Rochette-Egly,C., Chomienne,C., and Delva,L. (2001). The novel co-activator CRABPII binds to RARalpha and RXRalpha via two nuclear receptor interacting domains and does not require the AF-2 'core'. *FEBS Lett.* 507, 67-73.
- Bauer,U.M., Daujat,S., Nielsen,S.J., Nightingale,K., and Kouzarides,T. (2002). Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep.* 3, 39-44.
- Beck,F., Erler,T., Russell,A., and James,R. (1995). Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev. Dyn.* 204, 219-227.
- Behrens,J., von Kries,J.P., Kuhl,M., Bruhn,L., Wedlich,D., Grosschedl,R., and Birchmeier,W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.
- Bel-Vialar,S., Core,N., Terranova,R., Goudot,V., Boned,A., and Djabali,M. (2000). Altered retinoic acid sensitivity and temporal expression of Hox genes in polycomb-M33-deficient mice. *Dev. Biol.* 224, 238-249.
- Bel-Vialar,S., Itasaki,N., and Krumlauf,R. (2002). Initiating Hox gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Development* 129, 5103-5115.
- Beland,M., Pilon,N., Houle,M., Oh,K., Sylvestre,J.R., Prinos,P., and Lohnes,D. (2004). Cdx1 autoregulation is governed by a novel Cdx1-LEF1 transcription complex. *Mol. Cell Biol.* 24, 5028-5038.
- Bienz,M. (1998). TCF: transcriptional activator or repressor? *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 366-372.

Blanco,J.C., Minucci,S., Lu,J., Yang,X.J., Walker,K.K., Chen,H., Evans,R.M., Nakatani,Y., and Ozato,K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.* 12, 1638-1651.

Blaner,W.S. (1989). Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr. Rev.* 10, 308-316.

Blumberg,B., Wright,C.V., De Robertis,E.M., and Cho,K.W. (1991). Organizer-specific homeobox genes in *Xenopus laevis* embryos. *Science* 253, 194-196.

Boerman,M.H. and Napoli,J.L. (1995). Characterization of a microsomal retinol dehydrogenase: a short-chain alcohol dehydrogenase with integral and peripheral membrane forms that interacts with holo-CRBP (type I). *Biochemistry* 34, 7027-7037.

Bouillet,P., Oulad-Abdelghani,M., Ward,S.J., Bronner,S., Chambon,P., and Dolle,P. (1996). A new mouse member of the Wnt gene family, mWnt-8, is expressed during early embryogenesis and is ectopically induced by retinoic acid. *Mech. Dev* 58, 141-152.

Boutros,M., Mihaly,J., Bouwmeester,T., and Mlodzik,M. (2000). Signaling specificity by Frizzled receptors in *Drosophila*. *Science* 288, 1825-1828.

Boylan,J.F. and Gudas,L.J. (1992). The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J. Biol. Chem.* 267, 21486-21491.

Brannon,M., Gomperts,M., Sumoy,L., Moon,R.T., and Kimelman,D. (1997). A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev* 11, 2359-2370.

Breier,G., Bucan,M., Francke,U., Colberg-Poley,A.M., and Gruss,P. (1986). Sequential expression of murine homeo box genes during F9 EC cell differentiation. *EMBO J.* 5, 2209-2215.

Brooke,N.M., Garcia-Fernandez,J., and Holland,P.W. (1998). The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* 392, 920-922.

Brownell,J.E., Zhou,J., Ranalli,T., Kobayashi,R., Edmondson,D.G., Roth,S.Y., and Allis,C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.

Cavailles,V., Dauvois,S., Danielian,P.S., and Parker,M.G. (1994). Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 10009-10013.



Cavallo,R.A., Cox,R.T., Moline,M.M., Roose,J., Polevoy,G.A., Clevers,H., Peifer,M., and Bejsovec,A. (1998). *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395, 604-608.

Chai,X., Boerman,M.H., Zhai,Y., and Napoli,J.L. (1995a). Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase. A tissue-specific, short-chain alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 270, 3900-3904.

Chai,X., Zhai,Y., and Napoli,J.L. (1996). Cloning of a rat cDNA encoding retinol dehydrogenase isozyme type III. *Gene* 169, 219-222.

Chai,X., Zhai,Y., and Napoli,J.L. (1997). cDNA cloning and characterization of a cis-retinol/3alpha-hydroxysterol short-chain dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272, 33125-33131.

Chai,X., Zhai,Y., Popescu,G., and Napoli,J.L. (1995b). Cloning of a cDNA for a second retinol dehydrogenase type II. Expression of its mRNA relative to type I. *J. Biol. Chem.* 270, 28408-28412.

Chakravarti,D., LaMorte,V.J., Nelson,M.C., Nakajima,T., Schulman,I.G., Juguilon,H., Montminy,M., and Evans,R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383, 99-103.

Chambon,P. (1994). The retinoid signaling pathway: molecular and genetic analyses. *Semin. Cell Biol.* 5, 115-125.

Chambon,P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10, 940-954.

Chariot,A., van Lint,C., Chapelier,M., Gielen,J., Merville,M.P., and Bours,V. (1999). CBP and histone deacetylase inhibition enhance the transactivation potential of the HOXB7 homeodomain-containing protein. *Oncogene* 18, 4007-4014.

Charite,J., de Graaff,W., Consten,D., Reijnen,M.J., Korving,J., and Deschamps,J. (1998). Transducing positional information to the Hox genes: critical interaction of cdx gene products with position-sensitive regulatory elements. *Development* 125, 4349-4358.

Chauchereau,A., Amazit,L., Quesne,M., Guiochon-Mantel,A., and Milgrom,E. (2003). Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *J. Biol. Chem.* 278, 12335-12343.

Chawengsaksophak,K., de Graaff,W., Rossant,J., Deschamps,J., and Beck,F. (2004). Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 7641-7645.

Chawengsaksohak,K., James,R., Hammond,V.E., Kontgen,F., and Beck,F. (1997). Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 386, 84-87.

Chen,D., Ma,H., Hong,H., Koh,S.S., Huang,S.M., Schurter,B.T., Aswad,D.W., and Stallcup,M.R. (1999a). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284, 2174-2177.

Chen,G., Fernandez,J., Mische,S., and Courey,A.J. (1999b). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev.* 13, 2218-2230.

Chen,H., Lin,R.J., Xie,W., Wilpitz,D., and Evans,R.M. (1999c). Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 98, 675-686.

Chen,J.D. and Evans,R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.

Chiba,H., Muramatsu,M., Nomoto,A., and Kato,H. (1994). Two human homologues of *Saccharomyces cerevisiae* SWI2/SNF2 and *Drosophila* brachy are transcriptional coactivators cooperating with the estrogen receptor and the retinoic acid receptor. *Nucleic Acids Res.* 22, 1815-1820.

Conlon,R.A., Reaume,A.G., and Rossant,J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 121, 1533-1545.

Conlon,R.A. and Rossant,J. (1992). Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. *Development* 116, 357-368.

Cooney,A.J., Leng,X., Tsai,S.Y., O'Malley,B.W., and Tsai,M.J. (1993). Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of transactivation by the vitamin D, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *J. Biol. Chem.* 268, 4152-4160.

Cooney,A.J., Tsai,S.Y., O'Malley,B.W., and Tsai,M.J. (1992). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTCa response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Mol. Cell Biol.* 12, 4153-4163.

Cordes,R., Schuster-Gossler,K., Serth,K., and Gossler,A. (2004). Specification of vertebral identity is coupled to Notch signalling and the segmentation clock. *Development* 131, 1221-1233.

Davidson,A.J., Ernst,P., Wang,Y., Dekens,M.P., Kingsley,P.D., Palis,J., Korsmeyer,S.J., Daley,G.Q., and Zon,L.I. (2003). *cdx4* mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple *hox* genes. *Nature* 425, 300-306.

Deltour,L., Foglio,M.H., and Duester,G. (1999a). Impaired retinol utilization in *Adh4* alcohol dehydrogenase mutant mice. *Dev. Genet.* 25, 1-10.

Deltour,L., Foglio,M.H., and Duester,G. (1999b). Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase *Adh1*, *Adh3*, and *Adh4* null mutant mice. Overlapping roles of *Adh1* and *Adh4* in ethanol clearance and metabolism of retinol to retinoic acid. *J. Biol. Chem.* 274, 16796-16801.

Delva,L., Bastie,J.N., Rochette-Egly,C., Kraiba,R., Balitrand,N., Despouy,G., Chambon,P., and Chomienne,C. (1999). Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol. Cell Biol.* 19, 7158-7167.

Demarest,S.J., Martinez-Yamout,M., Chung,J., Chen,H., Xu,W., Dyson,H.J., Evans,R.M., and Wright,P.E. (2002). Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature* 415, 549-553.

Deschamps,J. and Wijgerde,M. (1993). Two phases in the establishment of HOX expression domains. *Dev. Biol.* 156, 473-480.

Diez,d.C., Olivera-Martinez,I., Goriely,A., Gale,E., Maden,M., and Storey,K. (2003). Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40, 65-79.

Dolle,P., Fraulob,V., Kastner,P., and Chambon,P. (1994). Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech. Dev.* 45, 91-104.

Dolle,P., Ruberte,E., Kastner,P., Petkovich,M., Stoner,C.M., Gudas,L.J., and Chambon,P. (1989). Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse. *Nature* 342, 702-705.

Dolle,P., Ruberte,E., Leroy,P., Morriss-Kay,G., and Chambon,P. (1990). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* 110, 1133-1151.

Domon-Dell,C. and Freund,J.N. (2002). Stimulation of *Cdx1* by oncogenic beta-catenin/Tcf4 in colon cancer cells; opposite effect of the CDX2 homeoprotein. *FEBS Lett.* 518, 83-87.

Dong,D., Ruuska,S.E., Levinthal,D.J., and Noy,N. (1999). Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J. Biol. Chem.* 274, 23695-23698.

Drager,U.C. and McCaffery,P. (1995). Retinoic acid synthesis in the developing spinal cord. *Adv. Exp. Med. Biol.* 372, 185-192.

Duboule,D. (1991). Patterning in the vertebrate limb. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1, 211-216.

Duboule,D. (1998). Vertebrate hox gene regulation: clustering and/or colinearity? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 514-518.

Duboule,D. and Dolle,P. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* 8, 1497-1505.

Dubrulle,J., McGrew,M.J., and Pourquie,O. (2001). FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* 106, 219-232.

Dubrulle,J. and Pourquie,O. (2004). fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. *Nature* 427, 419-422.

Duester,G. (2000). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267, 4315-4324.

Dupe,V., Ghyselinck,N.B., Wendling,O., Chambon,P., and Mark,M. (1999). Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* 126, 5051-5059.

Duprey,P., Chowdhury,K., Dressler,G.R., Balling,R., Simon,D., Guenet,J.L., and Gruss,P. (1988). A mouse gene homologous to the *Drosophila* gene caudal is expressed in epithelial cells from the embryonic intestine. *Genes & Development* 2, 1647-1654.

Dyson,E., Sucov,H.M., Kubalak,S.W., Schmid-Schonbein,G.W., DeLano,F.A., Evans,R.M., Ross,J., Jr., and Chien,K.R. (1995). Atrial-like phenotype is associated with embryonic ventricular failure in retinoid X receptor alpha -/- mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 7386-7390.

Evans,R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.

- Fawcett,D., Pasceri,P., Fraser,R., Colbert,M., Rossant,J., and Giguere,V. (1995). Postaxial polydactyly in forelimbs of CRABP-II mutant mice. *Development* 121, 671-679.
- Fawell,S.E., Lees,J.A., White,R., and Parker,M.G. (1990). Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell* 60, 953-962.
- Featherstone,M.S., Baron,A., Gaunt,S.J., Mattei,M.G., and Duboule,D. (1988). Hox-5.1 defines a homeobox-containing gene locus on mouse chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 4760-4764.
- Ferrier,D.E. and Holland,P.W. (2001). Ancient origin of the Hox gene cluster. *Nat. Rev. Genet.* 2, 33-38.
- Fiorella,P.D. and Napoli,J.L. (1991). Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* 266, 16572-16579.
- Firulli,B.A., Howard,M.J., McDaid,J.R., McIlreavey,L., Dionne,K.M., Centonze,V.E., Cserjesi,P., Virshup,D.M., and Firulli,A.B. (2003). PKA, PKC, and the protein phosphatase 2A influence HAND factor function: a mechanism for tissue-specific transcriptional regulation. *Mol. Cell* 12, 1225-1237.
- Fondell,J.D., Brunel,F., Hisatake,K., and Roeder,R.G. (1996a). Unliganded thyroid hormone receptor alpha can target TATA-binding protein for transcriptional repression. *Mol. Cell Biol.* 16, 281-287.
- Fondell,J.D., Ge,H., and Roeder,R.G. (1996b). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 8329-8333.
- Fondell,J.D., Guermah,M., Malik,S., and Roeder,R.G. (1999). Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive cofactors mediate thyroid hormone receptor function in the absence of the TATA box-binding protein-associated factors of TFIID. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 1959-1964.
- Forman,B.M., Umesono,K., Chen,J., and Evans,R.M. (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* 81, 541-550.
- Forman,B.M., Yang,C.R., Au,M., Casanova,J., Ghysdael,J., and Samuels,H.H. (1989). A domain containing leucine-zipper-like motifs mediate novel in vivo interactions between the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Mol. Endocrinol.* 3, 1610-1626.

- Frasch,M., Chen,X., and Lufkin,T. (1995). Evolutionary-conserved enhancers direct region-specific expression of the murine *Hoxa-1* and *Hoxa-2* loci in both mice and *Drosophila*. *Development* *121*, 957-974.
- Frischer,L.E., Hagen,F.S., and Garber,R.L. (1986). An inversion that disrupts the *Antennapedia* gene causes abnormal structure and localization of RNAs. *Cell* *47*, 1017-1023.
- Frumkin,A., Rangini,Z., Ben Yehuda,A., Gruenbaum,Y., and Fainsod,A. (1991). A chicken caudal homologue, *CHox-cad*, is expressed in the epiblast with posterior localization and in the early endodermal lineage. *Development - Supplement* *112*, 207-219.
- Fryer,C.J. and Archer,T.K. (1998). Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature* *393*, 88-91.
- Fujii,H., Sato,T., Kaneko,S., Gotoh,O., Fujii-Kuriyama,Y., Osawa,K., Kato,S., and Hamada,H. (1997). Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J.* *16*, 4163-4173.
- Galceran,J., Farinas,I., Depew,M.J., Clevers,H., and Grosschedl,R. (1999). *Wnt3a*<sup>-/-</sup>-like phenotype and limb deficiency in *Lef1*(<sup>-/-</sup>)*Tcf1*(<sup>-/-</sup>) mice. *Genes Dev* *13*, 709-717.
- Galceran,J., Hsu,S.C., and Grosschedl,R. (2001). Rescue of a *Wnt* mutation by an activated form of LEF-1: regulation of maintenance but not initiation of *Brachyury* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 8668-8673.
- Gamer,L.W. and Wright,C.V. (1993). Murine *Cdx-4* bears striking similarities to the *Drosophila* caudal gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech. Dev.* *43*, 71-81.
- Gaunt,S.J., Drage,D., and Cockley,A. (2003). Vertebrate caudal gene expression gradients investigated by use of chick *cdx-A/lacZ* and mouse *cdx-1/lacZ* reporters in transgenic mouse embryos: evidence for an intron enhancer. *Mech. Dev.* *120*, 573-586.
- Gaunt,S.J., Krumlauf,R., and Duboule,D. (1989). Mouse homeo-genes within a subfamily, *Hox-1.4*, *-2.6* and *-5.1*, display similar anteroposterior domains of expression in the embryo, but show stage- and tissue-dependent differences in their regulation. *Development* *107*, 131-141.
- Gavalas,A., Studer,M., Lumsden,A., Rijli,F.M., Krumlauf,R., and Chambon,P. (1998). *Hoxa1* and *Hoxb1* synergize in patterning the hindbrain, cranial nerves and second pharyngeal arch. *Development* *125*, 1123-1136.

Geadia, A.M., Gaunt, S.J., Azzawi, M., Shimeld, S.M., Pearce, J., and Sharpe, P.T. (1992). Sequence and embryonic expression of the murine Hox-3.5 gene. *Development* 116, 497-506.

Gebuhr, T.C., Bultman, S.J., and Magnuson, T. (2000). Pc-G/trx-G and the SWI/SNF connection: Developmental gene regulation through chromatin remodeling [Review]. *Genesis* 26, 189-197.

Gehring, W.J. (1993). Exploring the homeobox. *Gene* 135, 215-221.

Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., and Wuthrich, K. (1994). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211-223.

Gewinner, C., Hart, G., Zachara, N., Cole, R., Beisenherz-Huss, C., and Groner, B. (2004). The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *J. Biol. Chem.* 279, 3563-3572.

Ghyselinck, N.B., Bavik, C., Sapin, V., Mark, M., Bonnier, D., Hindelang, C., Dierich, A., Nilsson, C.B., Hakansson, H., Sauvaut, P., Azais-Braesco, V., Frasson, M., Picaud, S., and Chambon, P. (1999). Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J.* 18, 4903-4914.

Giguere, V. (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr. Rev.* 15, 61-79.

Giguere, V. and Evans, R.M. (1990). Identification of receptors for retinoids as members of the steroid and thyroid hormone receptor family. *Methods Enzymol.* 189, 223-232.

Giguere, V., Lyn, S., Yip, P., Siu, C.H., and Amin, S. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding a second cellular retinoic acid-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 6233-6237.

Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P., and Evans, R.M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-629.

Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.

Gorry, P., Lufkin, T., Dierich, A., Rochette-Egly, C., Decimo, D., Dolle, P., Mark, M., Durand, B., and Chambon, P. (1994). The cellular retinoic acid binding protein I is dispensable. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 9032-9036.

Gough, W.H., VanOoteghem, S., Sint, T., and Kedishvili, N.Y. (1998). cDNA cloning and characterization of a new human microsomal NAD<sup>+</sup>-dependent dehydrogenase that oxidizes all-trans-retinol and 3 $\alpha$ -hydroxysteroids. *J. Biol. Chem.* 273, 19778-19785.

- Gould,A. (1997). Functions of mammalian Polycomb group and trithorax group related genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 488-494.
- Gould,A., Itasaki,N., and Krumlauf,R. (1998). Initiation of rhombomeric Hoxb4 expression requires induction by somites and a retinoid pathway. *Neuron* 21, 39-51.
- Gould,A., Morrison,A., Sproat,G., White,R.A., and Krumlauf,R. (1997). Positive cross-regulation and enhancer sharing: two mechanisms for specifying overlapping Hox expression patterns. *Genes Dev* 11, 900-913.
- Graham,A., Papalopulu,N., and Krumlauf,R. (1989). The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57, 367-378.
- Greco,T.L., Takada,S., Newhouse,M.M., McMahon,J.A., McMahon,A.P., and Camper,S.A. (1996). Analysis of the vestigial tail mutation demonstrates that Wnt-3a gene dosage regulates mouse axial development. *Genes Dev.* 10, 313-324.
- Green,S. and Chambon,P. (1987). Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature* 325, 75-78.
- Green,S. and Chambon,P. (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* 4, 309-314.
- Green,S., Kumar,V., Theulaz,I., Wahli,W., and Chambon,P. (1988). The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity. *EMBO J.* 7, 3037-3044.
- Grosschedl,R., Giese,K., and Pagel,J. (1994). HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* 10, 94-100.
- Haeseleer,F., Huang,J., Lebiada,L., Saari,J.C., and Palczewski,K. (1998). Molecular characterization of a novel short-chain dehydrogenase/reductase that reduces all-trans-retinal. *J. Biol. Chem.* 273, 21790-21799.
- Halachmi,S., Marden,E., Martin,G., MacKay,H., Abbondanza,C., and Brown,M. (1994). Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 264, 1455-1458.
- Haselbeck,R.J., Hoffmann,I., and Duester,G. (1999). Distinct functions for Aldh1 and Raldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways. *Dev. Genet.* 25, 353-364.
- Hecht,A., Vleminckx,K., Stemmler,M.P., van Roy,F., and Kemler,R. (2000). The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.* 19, 1839-1850.



Heinzel,T., Lavinsky,R.M., Mullen,T.M., Soderstrom,M., Laherty,C.D., Torchia,J., Yang,W.M., Brard,G., Ngo,S.D., Davie,J.R., Seto,E., Eisenman,R.N., Rose,D.W., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387, 43-48.

Hogan,B.L., Beddington,R., Constantini,F., and Lacy,E. (1994). *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Horan,G.S., Kovacs,E.N., Behringer,R.R., and Featherstone,M.S. (1995a). Mutations in paralogous Hox genes result in overlapping homeotic transformations of the axial skeleton: evidence for unique and redundant function. *Dev. Biol.* 169, 359-372.

Horan,G.S., Ramirez-Solis,R., Featherstone,M.S., Wolgemuth,D.J., Bradley,A., and Behringer,R.R. (1995b). Compound mutants for the paralogous *hoxa-4*, *hoxb-4*, and *hoxd-4* genes show more complete homeotic transformations and a dose-dependent increase in the number of vertebrae transformed. *Genes Dev.* 9, 1667-1677.

Horlein,A.J., Naar,A.M., Heinzel,T., Torchia,J., Gloss,B., Kurokawa,R., Ryan,A., Kamei,Y., Soderstrom,M., and Glass,C.K. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Horn,J.M. and Ashworth,A. (1995). A member of the caudal family of homeobox genes maps to the X-inactivation centre region of the mouse and human X chromosomes. *Human Molecular Genetics* 4, 1041-1047.

Houle,M., Prinos,P., Iulianella,A., Bouchard,N., and Lohnes,D. (2000). Retinoic acid regulation of *Cdx1*: an indirect mechanism for retinoids and vertebral specification. *Mol. Cell Biol.* 20, 6579-6586.

Houle,M., Sylvestre,J.R., and Lohnes,D. (2003). Retinoic acid regulates a subset of *Cdx1* function in vivo. *Development* 130, 6555-6567.

Huang,D., Chen,S.W., Langston,A.W., and Gudas,L.J. (1998). A conserved retinoic acid responsive element in the murine *Hoxb-1* gene is required for expression in the developing gut. *Development - Supplement* 125, 3235-3246.

Huang,E.Y., Zhang,J., Miska,E.A., Guenther,M.G., Kouzarides,T., and Lazar,M.A. (2000). Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway. *Genes Dev* 14, 45-54.

Ichinose,H., Garnier,J.M., Chambon,P., and Losson,R. (1997). Ligand-dependent interaction between the estrogen receptor and the human homologues of SWI2/SNF2. *Gene* 188, 95-100.

Ikeda,S., Kishida,S., Yamamoto,H., Murai,H., Koyama,S., and Kikuchi,A. (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin and promotes GSK-3 $\beta$ -dependent phosphorylation of  $\beta$ -catenin. *EMBO J.* 17, 1371-1384.

Ikeya,M. and Takada,S. (2001). Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of *cdx-1* expression. *Mech. Dev* 103, 27-33.

Isaacs,H.V., Pownall,M.E., and Slack,J.M. (1994). eFGF regulates *Xbra* expression during *Xenopus* gastrulation. *EMBO J.* 13, 4469-4481.

Isaacs,H.V., Pownall,M.E., and Slack,J.M. (1995). eFGF is expressed in the dorsal midline of *Xenopus laevis*. *Int. J. Dev Biol.* 39, 575-579.

Isaacs,H.V., Pownall,M.E., and Slack,J.M. (1998). Regulation of *Hox* gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue *Xcad3*. *EMBO J.* 17, 3413-3427.

Iulianella,A., Beckett,B., Petkovich,M., and Lohnes,D. (1999). A molecular basis for retinoic acid-induced axial truncation. *Dev Biol.* 205, 33-48.

Iulianella,A., Melton,K.R., and Trainor,P.A. (2003). Somitogenesis: breaking new boundaries. *Neuron* 40, 11-14.

Izpisua-Belmonte,J.C., Falkenstein,H., Dolle,P., Renucci,A., and Duboule,D. (1991). Murine genes related to the *Drosophila* *AbdB* homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J.* 10, 2279-2289.

Jacobson,R.H., Ladurner,A.G., King,D.S., and Tjian,R. (2000). Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288, 1422-1425.

James,R. and Kazenwadel,J. (1991). Homeobox gene expression in the intestinal epithelium of adult mice. *Journal of Biological Chemistry* 266, 3246-3251.

Jenuwein,T. (2001). Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol.* 11, 266-273.

Jenuwein,T. and Allis,C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.

Jho,E.H., Zhang,T., Domon,C., Joo,C.K., Freund,J.N., and Costantini,F. (2002). Wnt/ $\beta$ -catenin/Tcf signaling induces the transcription of *Axin2*, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 22, 1172-1183.

Jouve,C., Palmeirim,I., Henrique,D., Beckers,J., Gossler,A., Ish-Horowicz,D., and Pourquie,O. (2000). Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1 in the presomitic mesoderm. *Development* 127, 1421-1429.

Kamachi,Y., Uchikawa,M., and Kondoh,H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* 16, 182-187

Kamei,Y., Xu,L., Heinzl,T., Torchia,J., Kurokawa,R., Gloss,B., Lin,S.C., Heyman,R.A., Rose,D.W., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414.

Kao,H.Y., Downes,M., Ordentlich,P., and Evans,R.M. (2000). Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev.* 14, 55-66.

Kastner,P., Grondona,J.M., Mark,M., Gansmuller,A., LeMeur,M., Decimo,D., Vonesch,J.L., Dolle,P., and Chambon,P. (1994). Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 78, 987-1003.

Kastner,P., Mark,M., Ghyselinck,N., Krezel,W., Dupe,V., Grondona,J.M., and Chambon,P. (1997). Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* 124, 313-326.

Kastner,P., Mark,M., Leid,M., Gansmuller,A., Chin,W., Grondona,J.M., Decimo,D., Krezel,W., Dierich,A., and Chambon,P. (1996). Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev* 10, 80-92.

Kessel,M. (1992). Respecification of vertebral identities by retinoic acid. *Development* 115, 487-501.

Kessel,M. and Gruss,P. (1991). Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* 67, 89-104.

Kieny,M., Mauger,A., and Sengel,P. (1972). Early regionalization of somitic mesoderm as studied by the development of axial skeleton of the chick embryo. *Dev. Biol.* 28, 142-161.

Kingston,R.E. and Narlikar,G.J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* 13, 2339-2352.

Kishi,M., Mizuseki,K., Sasai,N., Yamazaki,H., Shiota,K., Nakanishi,S., and Sasai,Y. (2000). Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* 127, 791-800.

Kishida,S., Yamamoto,H., Hino,S., Ikeda,S., Kishida,M., and Kikuchi,A. (1999). DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Mol. Cell Biol.* *19*, 4414-4422.

Kliwer,S.A., Umesono,K., Heyman,R.A., Mangelsdorf,D.J., Dyck,J.A., and Evans,R.M. (1992). Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 1448-1452.

Knittel,T., Kessel,M., Kim,M.H., and Gruss,P. (1995). A conserved enhancer of the human and murine Hoxa-7 gene specifies the anterior boundary of expression during embryonal development. *Development* *121*, 1077-1088.

Kondo,T. and Duboule,D. (1999). Breaking colinearity in the mouse HoxD complex. *Cell* *97*, 407-417.

Korinek,V., Barker,N., Moerer,P., van Donselaar,E., Huls,G., Peters,P.J., and Clevers,H. (1998a). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* *19*, 379-383.

Korinek,V., Barker,N., Willert,K., Molenaar,M., Roose,J., Wagenaar,G., Markman,M., Lamers,W., Destree,O., and Clevers,H. (1998b). Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Mol. Cell Biol.* *18*, 1248-1256.

Kraus,W.L. and Kadonaga,J.T. (1998). p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes Dev* *12*, 331-342.

Krezel,W., Dupe,V., Mark,M., Dierich,A., Kastner,P., and Chambon,P. (1996). RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta -/-RXR gamma -/- mutant mice are viable. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 9010-9014.

Krumlauf,R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* *78*, 191-201.

Kurokawa,R., DiRenzo,J., Boehm,M., Sugarman,J., Gloss,B., Rosenfeld,M.G., Heyman,R.A., and Glass,C.K. (1994). Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature* *371*, 528-531.

Kurokawa,R., Soderstrom,M., Horlein,A., Halachmi,S., Brown,M., Rosenfeld,M.G., and Glass,C.K. (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* *377*, 451-454.

Kurokawa,R., Yu,V.C., Naar,A., Kyakumoto,S., Han,Z., Silverman,S., Rosenfeld,M.G., and Glass,C.K. (1993). Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Dev.* *7*, 1423-1435.

Kwak,Y.T., Guo,J., Prajapati,S., Park,K.J., Surabhi,R.M., Miller,B., Gehrig,P., and Gaynor,R.B. (2003). Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol. Cell* 11, 1055-1066.

Labrecque,J., Dumas,F., Lacroix,A., and Bhat,P.V. (1995). A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem. J.* 305 ( Pt 2), 681-684.

Lampron,C., Rochette-Egly,C., Gorry,P., Dolle,P., Mark,M., Lufkin,T., LeMeur,M., and Chambon,P. (1995). Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 121, 539-548.

Langston,A.W. and Gudas,L.J. (1992). Identification of a retinoic acid responsive enhancer 3' of the murine homeobox gene Hox-1.6. *Mech. Dev.* 38, 217-227.

Leid,M., Kastner,P., Lyons,R., Nakshatri,H., Saunders,M., Zacharewski,T., Chen,J.Y., Staub,A., Garnier,J.M., and Mader,S. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68, 377-395.

Leng,X., Cooney,A.J., Tsai,S.Y., and Tsai,M.J. (1996). Molecular mechanisms of COUP-TF-mediated transcriptional repression: evidence for transrepression and active repression. *Mol. Cell Biol.* 16, 2332-2340.

Levin,M.S., Li,E., Ong,D.E., and Gordon,J.I. (1987). Comparison of the tissue-specific expression and developmental regulation of two closely linked rodent genes encoding cytosolic retinol-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 262, 7118-7124.

Li,E., Sucov,H.M., Lee,K.F., Evans,R.M., and Jaenisch,R. (1993). Normal development and growth of mice carrying a targeted disruption of the alpha 1 retinoic acid receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 1590-1594.

Li,J., O'Malley,B.W., and Wong,J. (2000). p300 requires its histone acetyltransferase activity and SRC-1 interaction domain to facilitate thyroid hormone receptor activation in chromatin. *Mol. Cell Biol.* 20, 2031-2042.

Lickert,H., Domon,C., Huls,G., Wehrle,C., Duluc,I., Clevers,H., Meyer,B.I., Freund,J.N., and Kemler,R. (2000). Wnt/(beta)-catenin signaling regulates the expression of the homeobox gene Cdx1 in embryonic intestine. *Development* 127, 3805-3813.

Lickert,H. and Kemler,R. (2002). Functional analysis of cis-regulatory elements controlling initiation and maintenance of early Cdx1 gene expression in the mouse. *Dev. Dyn.* 225, 216-220.

- Liu,P., Wakamiya,M., Shea,M.J., Albrecht,U., Behringer,R.R., and Bradley,A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat. Genet.* 22, 361-365.
- Lohnes,D., Kastner,P., Dierich,A., Mark,M., LeMeur,M., and Chambon,P. (1993). Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* 73, 643-658.
- Lohnes,D., Mark,M., Mendelsohn,C., Dolle,P., Decimo,D., LeMeur,M., Dierich,A., Gorry,P., and Chambon,P. (1995). Developmental roles of the retinoic acid receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 475-486.
- Lohnes,D., Mark,M., Mendelsohn,C., Dolle,P., Dierich,A., Gorry,P., Gansmuller,A., and Chambon,P. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* 120, 2723-2748.
- Lorentz,O., Duluc,I., Arcangelis,A.D., Simon-Assmann,P., Kedinger,M., and Freund,J.N. (1997). Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J. Cell Biol.* 139, 1553-1565.
- Lorentz,O., Suh,E.R., Taylor,J.K., Boudreau,F., and Traber,P.G. (1999). CREB-binding [corrected] protein interacts with the homeodomain protein Cdx2 and enhances transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 274, 7196-7199.
- Loudig,O., Babichuk,C., White,J., Abu-Abed,S., Mueller,C., and Petkovich,M. (2000). Cytochrome P450RAI(CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism. *Mol. Endocrinol.* 14, 1483-1497.
- Lufkin,T., Lohnes,D., Mark,M., Dierich,A., Gorry,P., Gaub,M.P., LeMeur,M., and Chambon,P. (1993). High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 7225-7229.
- Lufkin,T., Mark,M., Hart,C.P., Dolle,P., LeMeur,M., and Chambon,P. (1992). Homeotic transformation of the occipital bones of the skull by ectopic expression of a homeobox gene. *Nature* 359, 835-841.
- Luger,K. and Richmond,T.J. (1998). The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 140-146.
- Luo,J., Pasceri,P., Conlon,R.A., Rossant,J., and Giguere,V. (1995). Mice lacking all isoforms of retinoic acid receptor beta develop normally and are susceptible to the teratogenic effects of retinoic acid. *Mech. Dev.* 53, 61-71.

Lustig,B., Jerchow,B., Sachs,M., Weiler,S., Pietsch,T., Karsten,U., van De,W.M., Clevers,H., Schlag,P.M., Birchmeier,W., and Behrens,J. (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol. Cell Biol.* 22, 1184-1193.

Lyn,S. and Giguere,V. (1994). Localization of CRABP-I and CRABP-II mRNA in the early mouse embryo by whole-mount in situ hybridization: implications for teratogenesis and neural development. *Dev. Dyn.* 199, 280-291.

Macdonald,P.M. and Struhl,G. (1986). A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying the body pattern. *Nature* 324, 537-545.

Maden,M., Graham,A., Zile,M., and Gale,E. (2000). Abnormalities of somite development in the absence of retinoic acid. *Int. J. Dev Biol.* 44, 151-159.

Mangelsdorf,D.J., Borgmeyer,U., Heyman,R.A., Zhou,J.Y., Ong,E.S., Oro,A.E., Kakizuka,A., and Evans,R.M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* 6, 329-344.

Mangelsdorf,D.J. and Evans,R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.

Mann,R.S. and Affolter,M. (1998). Hox proteins meet more partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 423-429.

Margalit,Y., Yarus,S., Shapira,E., Gruenbaum,Y., and Fainsod,A. (1993). Isolation and characterization of target sequences of the chicken *CdxA* homeobox gene. *Nucleic Acids Research* 21, 4915-4922.

Marom,K., Shapira,E., and Fainsod,A. (1997). The chicken caudal genes establish an anterior-posterior gradient by partially overlapping temporal and spatial patterns of expression. *Mech. Dev* 64, 41-52.

Marshall,H., Morrison,A., Studer,M., Popperl,H., and Krumlauf,R. (1996). Retinoids and Hox genes. *FASEB J.* 10, 969-978.

Marshall,H., Studer,M., Popperl,H., Aparicio,S., Kuroiwa,A., Brenner,S., and Krumlauf,R. (1994). A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene *Hoxb-1*. *Nature* 370, 567-571.

Mcginnis,W. and Krumlauf,R. (1992). Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.

McKenzie,E.A., Kent,N.A., Dowell,S.J., Moreno,F., Bird,L.E., and Mellor,J. (1993). The centromere and promoter factor, 1, CPF1, of *Saccharomyces cerevisiae* modulates gene activity through a family of factors including SPT21, RPD1 (SIN3), RPD3 and CCR4. *Mol. Gen. Genet.* 240, 374-386.

McLain,K., Schreiner,C., Yager,K.L., Stock,J.L., and Potter,S.S. (1992). Ectopic expression of Hox-2.3 induces craniofacial and skeletal malformations in transgenic mice. *Mech. Dev.* 39, 3-16.

Mendelsohn,C., Lohnes,D., Decimo,D., Lufkin,T., LeMeur,M., Chambon,P., and Mark,M. (1994a). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 120, 2749-2771.

Mendelsohn,C., Mark,M., Dolle,P., Dierich,A., Gaub,M.P., Krust,A., Lampron,C., and Chambon,P. (1994b). Retinoic acid receptor beta 2 (RAR beta 2) null mutant mice appear normal. *Dev. Biol.* 166, 246-258.

Meyer,B.I. and Gruss,P. (1993). Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development* 117, 191-203.

Mlodzik,M., Fjose,A., and Gehring,W.J. (1985). Isolation of caudal, a Drosophila homeo box-containing gene with maternal expression whose transcripts form a concentration gradient at the pre-blastoderm stage. *EMBO J.* 4, 2961-2969.

Mlodzik,M. and Gehring,W.J. (1987). Expression of the caudal gene in the germ line of Drosophila: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell* 48, 465-478.

Molenaar,M., van De,W.M., Oosterwegel,M., Peterson-Maduro,J., Godsave,S., Korinek,V., Roose,J., Destree,O., and Clevers,H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos. *Cell* 86, 391-399.

Mollard,R., Viville,S., Ward,S.J., Decimo,D., Chambon,P., and Dolle,P. (2000). Tissue-specific expression of retinoic acid receptor isoform transcripts in the mouse embryo. *Mech. Dev.* 94, 223-232.

Moreno,E. and Morata,G. (1999). Caudal is the Hox gene that specifies the most posterior Drosophila segment. *Nature* 400, 873-877.

Moreno,T.A. and Kintner,C. (2004). Regulation of segmental patterning by retinoic acid signaling during Xenopus somitogenesis. *Dev. Cell* 6, 205-218.

Morrison,A., Moroni,M.C., Ariza-McNaughton,L., Krumlauf,R., and Mavilio,F. (1996). In vitro and transgenic analysis of a human HOXD4 retinoid-responsive enhancer. *Development - Supplement* 122, 1895-1907.

Morriss-Kay,G., Ward,S., and Sokolova,N. (1994). The role of retinoids in normal development and retinoid-induced malformations. *Arch. Toxicol. Suppl* 16, 112-117.



- Muchardt,C. and Yaniv,M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 12, 4279-4290.
- Munke,M., Cox,D.R., Jackson,I.J., Hogan,B.L., and Francke,U. (1986). The murine Hox-2 cluster of homeo box containing genes maps distal on chromosome 11 near the tail-short (Ts) locus. *Cytogenet. Cell Genet.* 42, 236-240.
- Myers,L.C. and Kornberg,R.D. (2000). Mediator of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 729-749.
- Nagpal,S., Friant,S., Nakshatri,H., and Chambon,P. (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *EMBO J.* 12, 2349-2360.
- Nagpal,S., Saunders,M., Kastner,P., Durand,B., Nakshatri,H., and Chambon,P. (1992). Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell* 70, 1007-1019.
- Nagy,L., Kao,H.Y., Chakravarti,D., Lin,R.J., Hassig,C.A., Ayer,D.E., Schreiber,S.L., and Evans,R.M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89, 373-380.
- Narlikar,G.J., Fan,H.Y., and Kingston,R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription [Review]. *Cell* 108, 475-487.
- Niederreither,K., McCaffery,P., Drager,U.C., Chambon,P., and Dolle,P. (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech. Dev.* 62, 67-78.
- Niederreither,K., Subbarayan,V., Dolle,P., and Chambon,P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nature Genetics* 21, 444-448.
- Niederreither,K., Vermot,J., Schuhbaur,B., Chambon,P., and Dolle,P. (2000). Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development* 127, 75-85.
- Nolte,C., Amores,A., Nagy,K.E., Postlethwait,J., and Featherstone,M. (2003). The role of a retinoic acid response element in establishing the anterior neural expression border of Hoxd4 transgenes. *Mech. Dev.* 120, 325-335.
- Northrop,J.L. and Kimelman,D. (1994). Dorsal-ventral differences in Xcad-3 expression in response to FGF-mediated induction in *Xenopus*. *Developmental Biology* 161, 490-503.

- Nowicki,J.L. and Burke,A.C. (2000). Hox genes and morphological identity: axial versus lateral patterning in the vertebrate mesoderm. *Development* 127, 4265-4275.
- Ogryzko,V.V., Kotani,T., Zhang,X., Schiltz,R.L., Howard,T., Yang,X.J., Howard,B.H., Qin,J., and Nakatani,Y. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94, 35-44.
- Ogryzko,V.V., Schiltz,R.L., Russanova,V., Howard,B.H., and Nakatani,Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- Ong,D.E. (1987). Cellular retinoid-binding proteins. *Arch. Dermatol.* 123, 1693-1695a.
- Oosterwegel,M., van De,W.M., Timmerman,J., Kruisbeek,A., Destree,O., Meijlink,F., and Clevers,H. (1993). Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development* 118, 439-448.
- Owen-Hughes,T., Utley,R.T., Cote,J., Peterson,C.L., and Workman,J.L. (1996). Persistent site-specific remodeling of a nucleosome array by transient action of the SWI/SNF complex. *Science* 273, 513-516.
- Packer,A.I., Crotty,D.A., Elwell,V.A., and Wolgemuth,D.J. (1998). Expression of the murine Hoxa4 gene requires both autoregulation and a conserved retinoic acid response element. *Development* 125, 1991-1998.
- Park,J.I., Tsai,S.Y., and Tsai,M.J. (2003). Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J. Med.* 52, 174-181.
- Partanen,J., Schwartz,L., and Rossant,J. (1998). Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for Fgfr1 in anteroposterior patterning of mouse embryos. *Genes Dev* 12, 2332-2344.
- Penzes,P., Wang,X., and Napoli,J.L. (1997). Enzymatic characteristics of retinal dehydrogenase type I expressed in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1342, 175-181.
- Pereira,F.A., Qiu,Y., Zhou,G., Tsai,M.J., and Tsai,S.Y. (1999). The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev.* 13, 1037-1049.
- Perlmann,T., Rangarajan,P.N., Umesono,K., and Evans,R.M. (1993). Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev.* 7, 1411-1422.

- Perlmann,T. and Vennstrom,B. (1995). The sound of silence. *Nature* 377, 387-388.
- Peterson,C.L. and Workman,J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 187-192.
- Petkovich,M., Brand,N.J., Krust,A., and Chambon,P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-450.
- Pevny,L.H. and Lovell-Badge,R. (1997). Sox genes find their feet. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 338-344.
- Pilon,N., Oh,K., Sylvestre,J.R., Bouchard,N., and Lohnes,D. (2004a). Cdx4 is a direct target of the canonical Wnt pathway. In Preparation.
- Pilon,N., Sylvestre,J.-R., and Lohnes,D. (2004b). Proximal LEF/TCF response elements are key mediators of Cdx1 expression and function in vivo. In Preparation.
- Polesskaya,A., Naguibneva,I., Duquet,A., Bengal,E., Robin,P., and Harel-Bellan,A. (2001). Interaction between acetylated MyoD and the bromodomain of CBP and/or p300. *Mol. Cell Biol.* 21, 5312-5320.
- Pollard,S.L. and Holland,P.W. (2000). Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry. *Curr. Biol.* 10, 1059-1062.
- Popperl,H., Bienz,M., Studer,M., Chan,S.K., Aparicio,S., Brenner,S., Mann,R.S., and Krumlauf,R. (1995). Segmental expression of Hoxb-1 is controlled by a highly conserved autoregulatory loop dependent upon exd/pbx. *Cell* 81, 1031-1042.
- Popperl,H. and Featherstone,M.S. (1992). An autoregulatory element of the murine Hox-4.2 gene. *EMBO Journal* 11, 3673-3680.
- Popperl,H. and Featherstone,M.S. (1993). Identification of a retinoic acid response element upstream of the murine Hox-4.2 gene. *Molecular & Cellular Biology* 13, 257-265.
- Powers,C.J., McLeskey,S.W., and Wellstein,A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling [Review]. *Endocrine-Related Cancer* 7, 165-197.
- Pownall,M.E., Tucker,A.S., Slack,J.M., and Isaacs,H.V. (1996). eFGF, Xcad3 and Hox genes form a molecular pathway that establishes the anteroposterior axis in *Xenopus*. *Development* 122, 3881-3892.

- Prinos,P., Joseph,S., Oh,K., Meyer,B.I., Gruss,P., and Lohnes,D. (2001). Multiple pathways governing Cdx1 expression during murine development. *Dev. Biol.* 239, 257-269.
- Qiu,Y., Pereira,F.A., DeMayo,F.J., Lydon,J.P., Tsai,S.Y., and Tsai,M.J. (1997). Null mutation of mCOUP-TFI results in defects in morphogenesis of the glossopharyngeal ganglion, axonal projection, and arborization. *Genes Dev.* 11, 1925-1937.
- Rachez,C., Gamble,M., Chang,C.P., Atkins,G.B., Lazar,M.A., and Freedman,L.P. (2000). The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol. Cell Biol.* 20, 2718-2726.
- Rachez,C., Lemon,B.D., Suldan,Z., Bromleigh,V., Gamble,M., Naar,A.M., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Freedman,L.P. (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 398, 824-828.
- Rachez,C., Suldan,Z., Ward,J., Chang,C.P., Burakov,D., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Freedman,L.P. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* 12, 1787-1800.
- Ramirez-Solis,R., Zheng,H., Whiting,J., Krumlauf,R., and Bradley,A. (1993). Hoxb-4 (Hox-2.6) mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra and defects in the closure of the sternal rudiments. *Cell* 73, 279-294.
- Ray,W.J., Bain,G., Yao,M., and Gottlieb,D.I. (1997). CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J. Biol. Chem.* 272, 18702-18708.
- Ren,Y., Behre,E., Ren,Z., Zhang,J., Wang,Q., and Fondell,J.D. (2000). Specific structural motifs determine TRAP220 interactions with nuclear hormone receptors. *Mol. Cell Biol.* 20, 5433-5446.
- Rice,J.C. and Allis,C.D. (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 263-273.
- Riese,J., Yu,X., Munnerlyn,A., Eresh,S., Hsu,S.C., Grosschedl,R., and Bienz,M. (1997). LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell* 88, 777-787.
- Roose,J., Molenaar,M., Peterson,J., Hurenkamp,J., Brantjes,H., Moerer,P., van De,W.M., Destree,O., and Clevers,H. (1998). The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608-612.

Rossant,J., Zirngibl,R., Cado,D., Shago,M., and Giguere,V. (1991). Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5, 1333-1344.

Ruberte,E., Dolle,P., Chambon,P., and Morriss-Kay,G. (1991). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development* 111, 45-60.

Ruberte,E., Dolle,P., Krust,A., Zelent,A., Morriss-Kay,G., and Chambon,P. (1990). Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. *Development* 108, 213-222.

Ruberte,E., Friederich,V., Chambon,P., and Morriss-Kay,G. (1993). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development. *Development* 118, 267-282.

Sakai,Y., Meno,C., Fujii,H., Nishino,J., Shiratori,H., Saijoh,Y., Rossant,J., and Hamada,H. (2001). The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev* 15, 213-225.

Saleh,M., Rambaldi,I., Yang,X.J., and Featherstone,M.S. (2000). Cell signaling switches HOX-PBX complexes from repressors to activators of transcription mediated by histone deacetylases and histone acetyltransferases. *Mol. Cell Biol.* 20, 8623-8633.

Salic,A., Lee,E., Mayer,L., and Kirschner,M.W. (2000). Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell* 5, 523-532.

Schurter,B.T., Koh,S.S., Chen,D., Bunick,G.J., Harp,J.M., Hanson,B.L., Henschen-Edman,A., Mackay,D.R., Stallcup,M.R., and Aswad,D.W. (2001). Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry* 40, 5747-5756.

Serrano,J., Scavo,L., Roth,J., de la Rosa,E.J., and de Pablo,F. (1993). A novel chicken homeobox-containing gene expressed in neurulating embryos. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 190, 270-276.

Sheppard,H.M., Harries,J.C., Hussain,S., Bevan,C., and Heery,D.M. (2001). Analysis of the steroid receptor coactivator 1 (SRC1)-CREB binding protein interaction interface and its importance for the function of SRC1. *Mol. Cell Biol.* 21, 39-50.

Shibata,H., Nawaz,Z., Tsai,S.Y., O'Malley,B.W., and Tsai,M.J. (1997). Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT). *Mol. Endocrinol.* *11*, 714-724.

Simeone,A., Acampora,D., Arcioni,L., Andrews,P.W., Boncinelli,E., and Mavilio,F. (1990). Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* *346*, 763-766.

Simon,J.A. and Tamkun,J.W. (2002). Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *12*, 210-218.

Slusarski,D.C., Corces,V.G., and Moon,R.T. (1997). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* *390*, 410-413.

Smalley,M.J., Sara,E., Paterson,H., Naylor,S., Cook,D., Jayatilake,H., Fryer,L.G., Hutchinson,L., Fry,M.J., and Dale,T.C. (1999). Interaction of axin and Dvl-2 proteins regulates Dvl-2-stimulated TCF-dependent transcription. *EMBO J.* *18*, 2823-2835.

Smirnov,D.A., Hou,S., and Ricciardi,R.P. (2000). Association of histone deacetylase with COUP-TF in tumorigenic Ad12-transformed cells and its potential role in shut-off of MHC class I transcription. *Virology* *268*, 319-328.

Stillman,D.J., Dorland,S., and Yu,Y. (1994). Epistasis analysis of suppressor mutations that allow HO expression in the absence of the yeast SW15 transcriptional activator. *Genetics* *136*, 781-788.

Strahl,B.D. and Allis,C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41-45.

Studer,M., Popperl,H., Marshall,H., Kuroiwa,A., and Krumlauf,R. (1994). Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of Hoxb-1. *Science* *265*, 1728-1732.

Su,J., Chai,X., Kahn,B., and Napoli,J.L. (1998). cDNA cloning, tissue distribution, and substrate characteristics of a cis-Retinol/3alpha-hydroxysterol short-chain dehydrogenase isozyme. *J. Biol. Chem.* *273*, 17910-17916.

Subbarayan,V., Kastner,P., Mark,M., Dierich,A., Gorry,P., and Chambon,P. (1997). Limited specificity and large overlap of the functions of the mouse RAR gamma 1 and RAR gamma 2 isoforms. *Mech. Dev.* *66*, 131-142.

Subramanian,V., Meyer,B.I., and Gruss,P. (1995). Disruption of the murine homeobox gene *Cdx1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* 83, 641-653.

Sucov,H.M., Dyson,E., Gumeringer,C.L., Price,J., Chien,K.R., and Evans,R.M. (1994). RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev.* 8, 1007-1018.

Svensson,S., Stromberg,P., and Hoog,J.O. (1999). A novel subtype of class II alcohol dehydrogenase in rodents. Unique Pro(47) and Ser(182) modulates hydride transfer in the mouse enzyme. *J. Biol. Chem.* 274, 29712-29719.

Takada,S., Stark,K.L., Shea,M.J., Vassileva,G., McMahon,J.A., and McMahon,A.P. (1994). Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev* 8, 174-189.

Takemaru,K.I. and Moon,R.T. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.* 149, 249-254.

Tam,P.P. (1984). The histogenetic capacity of tissues in the caudal end of the embryonic axis of the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 82, 253-266.

Tam,P.P. (1986). A study of the pattern of prospective somites in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 92, 269-285.

Tam,P.P. (1989). Regionalisation of the mouse embryonic ectoderm: allocation of prospective ectodermal tissues during gastrulation. *Development* 107, 55-67.

Tam,P.P. and Beddington,R.S. (1987). The formation of mesodermal tissues in the mouse embryo during gastrulation and early organogenesis. *Development* 99, 109-126.

Tam,P.P. and Tan,S.S. (1992). The somitogenetic potential of cells in the primitive streak and the tail bud of the organogenesis-stage mouse embryo. *Development* 115, 703-715.

Taunton,J., Hassig,C.A., and Schreiber,S.L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408-411.

Taylor,J.K., Levy,T., Suh,E.R., and Traber,P.G. (1997). Activation of enhancer elements by the homeobox gene *Cdx2* is cell line specific. *Nucleic Acids Res.* 25, 2293-2300.

Tran,P., Zhang,X.K., Salbert,G., Hermann,T., Lehmann,J.M., and Pfahl,M. (1992). COUP orphan receptors are negative regulators of retinoic acid response pathways. *Mol. Cell Biol.* 12, 4666-4676.

Tsai,S.Y. and Tsai,M.J. (1997). Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. *Endocr. Rev.* 18, 229-240.

Umesono,K., Giguere,V., Glass,C.K., Rosenfeld,M.G., and Evans,R.M. (1988). Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* 336, 262-265.

Umesono,K., Murakami,K.K., Thompson,C.C., and Evans,R.M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65, 1255-1266.

van Den,A.E., Forlani,S., Chawengsaksophak,K., de Graaff,W., Beck,F., Meyer,B.I., and Deschamps,J. (2002). Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development* 129, 2181-2193.

van Den,A.E., Reijnen,M., Korving,J., Brouwer,A., Meijlink,F., and Deschamps,J. (1999). Targeted inactivation of Hoxb8 affects survival of a spinal ganglion and causes aberrant limb reflexes. *Mech. Dev.* 89, 103-114.

van Genderen,C., Okamura,R.M., Farinas,I., Quo,R.G., Parslow,T.G., Bruhn,L., and Grosschedl,R. (1994). Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.* 8, 2691-2703.

Verbeek,S., Izon,D., Hofhuis,F., Robanus-Maandag,E., te,R.H., van De,W.M., Oosterwegel,M., Wilson,A., MacDonald,H.R., and Clevers,H. (1995). An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* 374, 70-74.

Vidal,M. and Gaber,R.F. (1991). RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 11, 6317-6327.

Vidal,M., Strich,R., Esposito,R.E., and Gaber,R.F. (1991). RPD1 (SIN3/UME4) is required for maximal activation and repression of diverse yeast genes. *Mol. Cell Biol.* 11, 6306-6316.

Vleminckx,K., Kemler,R., and Hecht,A. (1999). The C-terminal transactivation domain of beta-catenin is necessary and sufficient for signaling by the LEF-1/beta-catenin complex in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 81, 65-74.

Wang,X., Penzes,P., and Napoli,J.L. (1996). Cloning of a cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. Recognition of retinal as substrate. *J. Biol. Chem.* 271, 16288-16293.

Wegner,M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* 27, 1409-1420.



Wendling,O., Ghyselinck,N.B., Chambon,P., and Mark,M. (2001). Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning. *Development* 128, 2031-2038.

White,J.A., Beckett-Jones,B., Guo,Y.D., Dilworth,F.J., Bonasoro,J., Jones,G., and Petkovich,M. (1997). cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J. Biol. Chem.* 272, 18538-18541.

White,J.A., Guo,Y.D., Baetz,K., Beckett-Jones,B., Bonasoro,J., Hsu,K.E., Dilworth,F.J., Jones,G., and Petkovich,M. (1996). Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4- hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 271, 29922-29927.

WILSON,J.G., ROTH,C.B., and WARKANY,J. (1953). An analysis of the syndrome of maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am. J. Anat.* 92, 189-217.

Wodarz,A. and Nusse,R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 59-88.

Wolbach,S.B. and Howe,P.R. (1925). Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *J. Exp. Med* 42, 753-777.

Wood,H.B. and Episkopou,V. (1999). Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mech. Dev.* 86, 197-201.

Xu,F., Li,H., and Jin,T. (1999). Cell type-specific autoregulation of the Caudal-related homeobox gene Cdx-2/3. *J. Biol. Chem.* 274, 34310-34316.

Yamaguchi,T.P., Bradley,A., McMahon,A.P., and Jones,S. (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126, 1211-1223.

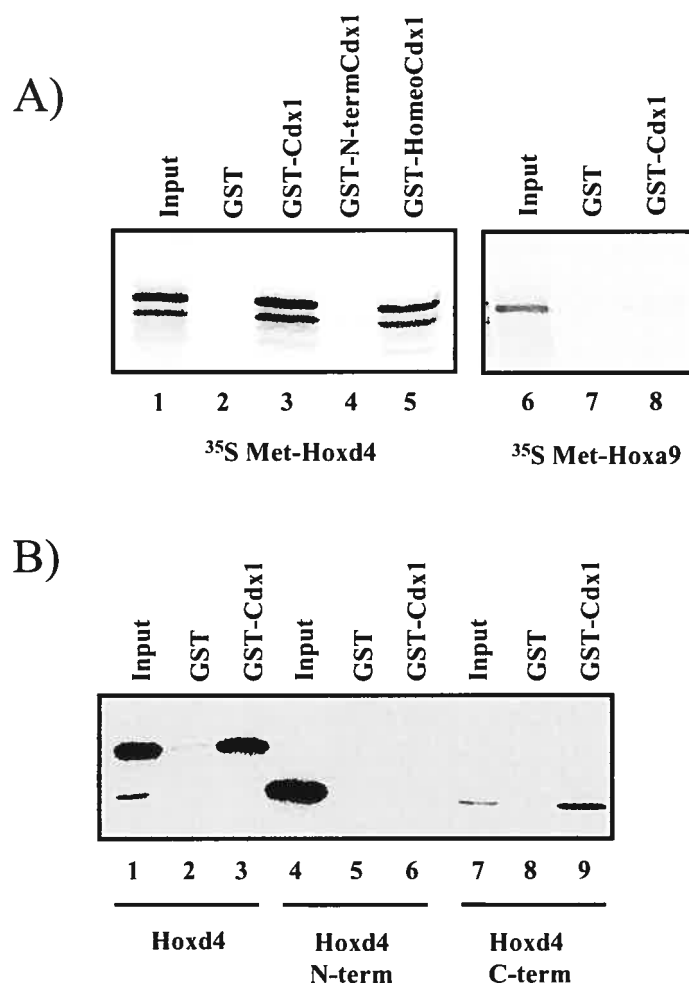
Yang,X.J., Ogryzko,V.V., Nishikawa,J., Howard,B.H., and Nakatani,Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382, 319-324.

Yu,V.C., Delsert,C., Andersen,B., Holloway,J.M., Devary,O.V., Naar,A.M., Kim,S.Y., Boutin,J.M., Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1991). RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67, 1251-1266.

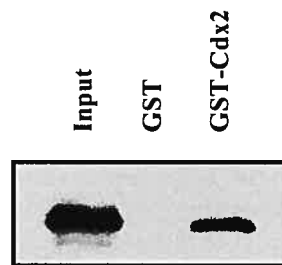
Yuan,C.X., Ito,M., Fondell,J.D., Fu,Z.Y., and Roeder,R.G. (1998). The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor- associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7939-7944.

- Yuan,H., Corbi,N., Basilico,C., and Dailey,L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* 9, 2635-2645.
- Zakany,J., Kmita,M., Alarcon,P., de la Pompa,J.L., and Duboule,D. (2001). Localized and transient transcription of Hox genes suggests a link between patterning and the segmentation clock. *Cell* 106, 207-217.
- Zechel,C., Shen,X.Q., Chen,J.Y., Chen,Z.P., Chambon,P., and Gronemeyer,H. (1994). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J.* 13, 1425-1433.
- Zhang,F., Popperl,H., Morrison,A., Kovacs,E.N., Prideaux,V., Schwarz,L., Krumlauf,R., Rossant,J., and Featherstone,M.S. (1997a). Elements both 5' and 3' to the murine Hoxd4 gene establish anterior borders of expression in mesoderm and neurectoderm. *Mechanisms of Development* 67, 49-58.
- Zhang,J., Guenther,M.G., Carthew,R.W., and Lazar,M.A. (1998). Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev.* 12, 1775-1780.
- Zhang,Y., Iratni,R., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Reinberg,D. (1997b). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 89, 357-364.
- Zhao,D., McCaffery,P., Ivins,K.J., Neve,R.L., Hogan,P., Chin,W.W., and Drager,U.C. (1996). Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 240, 15-22.

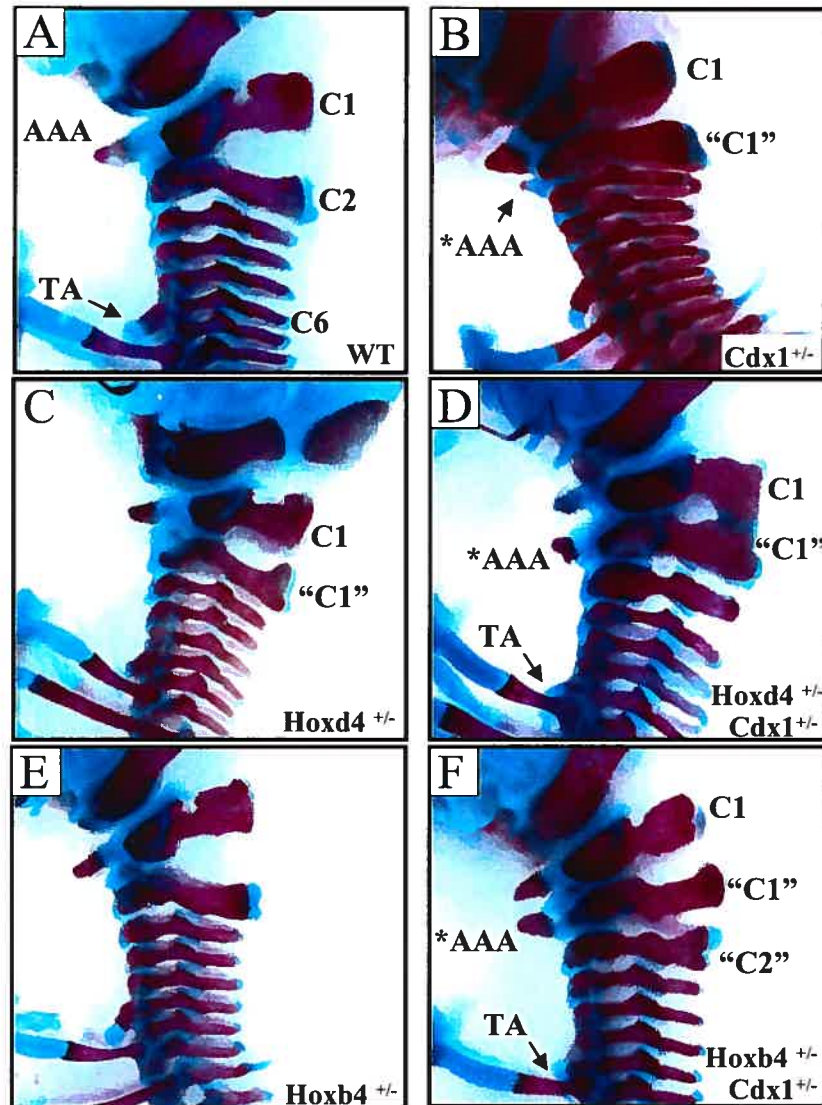
## **ANNEXE**



**Figure A-1** Cdx1 interagit directement avec Hoxd4. Les réactions ont été effectuées à l'aide de protéines de fusion GST-Cdx1 incubées en présence (A) de protéines Hoxd4 (ou Hoxa9) transcrites/traduites *in vitro* et marquée (<sup>35</sup>S-Met) ou (B) d'extraits nucléaires de cellules Cos7 transfectées avec un vecteur encodant différentes protéines de fusion Flag-Hoxd4. La présence d'une interaction est détectée par autoradiographie (A) ou par western blot avec un anticorps anti-Flag (B). Input correspond à 20% de la quantité de protéines utilisée pour les réactions de liaison. (A) La forme pleine longueur de Cdx1 (GST-Cdx1) et son homeodomaine (GST-Cdx1Homeo) interagissent avec Hoxd4 (puits 3 et 5), contrairement aux séquences du domaine N-terminal (Cdx1 N-term) (puits 4). Cdx1 n'interagit pas avec Hoxa9 (puits 8). (B) Le domaine C-terminal de Hoxd4 (Hoxd4 C-term) est impliqué dans l'interaction avec Cdx1 (puits 9).



**Figure A-2** Cdx2 interagit aussi avec Hoxd4. Les réactions ont été effectuées à l'aide d'une protéines de fusion GST-Cdx2 incubée en présence d'extraits nucléaires de cellules Cos7 transfectées avec un vecteur encodant la protéine de fusion Flag-Hoxd4. La présence d'une interaction est détectée par western blot avec un anticorps anti-Flag. Input correspond à 20% de la quantité de protéines utilisée pour les réactions de liaison.



**Figure A-3** Analyse du squelette des double-mutants *Hox/Cdx1*. La région cervicale de préparations de squelettes de souris (A) sauvages, (B) *Cdx1*<sup>+/-</sup>, (C) *Hoxd4*<sup>+/-</sup>, (D) *Hoxd4*<sup>+/-</sup>*Cdx1*<sup>+/-</sup>, (E) *Hoxb4*<sup>+/-</sup> et (F) *Hoxb4*<sup>+/-</sup>*Cdx1*<sup>+/-</sup>. Abréviations : AAA, arche antérieure de l'atlas; \*AAA, arche antérieure de l'atlas ectopique; C, vertèbre cervicale; TA, tubercule antérieur. Les guillemets indiquent la présence de transformations homéotiques. (D et F) Noter la présence du TA sur C7 au lieu de C6.

**Table A-1**  
Phénotype vertébral des mutants Hox-Cdx1

Phénotype	Génotype				
	<i>Cdx1</i> <sup>+/-</sup> n=10 (%)	<i>Hoxd4</i> <sup>+/-</sup> n=10 (%)	<i>Hoxb4</i> <sup>+/-</sup> n=10 (%)	<i>Hoxd4</i> <sup>+/-</sup> <i>Cdx1</i> <sup>+/-</sup> n=12 (%)	<i>Hoxb4</i> <sup>+/-</sup> <i>Cdx1</i> <sup>+/-</sup> n=12 (%)
<b>Vertèbre 1</b> AN malformé	60	20	0	83	58
<b>Vertèbre 2</b> Identité C1: AAA AN élargit AN malformé	20 40 0	0 10 40	0 0 0	92 92 42	67 92 33
<b>Vertèbre 3</b> Identité C2 AN malformé	0 0	0 0	0 0	17 17	25 8
<b>Fusion des AN</b> V1-V2 V2-V3	0 0	0 0	0 0	33 0	0 17
<b>Vertèbre 6</b> Identité C5 (pas de TA)	0	0	0	42	42
<b>Vertèbre 7</b> Identité C6 (TA)	0	0	0	42	42

